

Proyecto Fin de Carrera

ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE LA ESCHERICHIA COLI EN AGUAS MEDIANTE PROCESOS DE FOTOCATÁLISIS.

Autor:

SAÚL CANALÍS ARISTE

DIRECTOR

Jorge Jesús Rodríguez Chueca

PONENTE

Rosa Mosteo Abad

ESPECIALIDAD

Química Industrial

CONVOCATORIA

Mayo/Junio 2013

ÍNDICE

Resumen.....	11
1. Introducción y objetivos.....	15
2. Control de calidad de las aguas de abastecimiento.....	19
2.1.Desinfección de aguas.....	19
2.2.Normas de calidad microbiológica en aguas.....	20
2.3.Contaminación biológica.....	22
2.3.1. Virus.....	23
2.3.2. Protozoos.....	24
2.3.3. Bacterias.....	24
3. Procesos de desinfección	27
3.1.Procesos convencionales de desinfección.....	27
3.2. Procesos avanzados de desinfección.....	29
3.2.1. Generalidades.....	29
3.1.1. Radiación solar con H ₂ O ₂	31
3.1.2. Fotocatálisis.....	32
3.1.3. Fotocatálisis combinado con oxidantes.....	33
3.1.4. Ozonización/Fotocatálisis/H ₂ O ₂	35
4. Procedimiento experimental.....	37
4.1. Análisis microbiológico para <i>E.Coli</i>	37
4.1.1. Procedimiento normalizado.....	37
4.1.2. Medios de cultivo.....	37

4.1.3.	Equipos y material de laboratorio.....	39
4.1.4.	Diluciones decimales seriadas.....	39
4.1.5.	Método de filtración de membrana e incubación.....	41
4.1.6.	Recuento e inactivación.....	43
4.2.	Preparación de muestras fortificadas.....	43
4.3.	Metodología de análisis de parámetros físico-químicos.....	44
4.4.	Experimentos de fotocátalisis.....	45
4.4.1.	Materiales y reactivos.....	45
4.4.2.	Agentes de reacción.....	46
4.4.3.	Condiciones de operación.....	49
4.5.	Procedimiento para la determinación de cinéticas.....	50
4.5.1.	Modelos cinéticos.....	51
4.5.2.	Ajuste de datos experimentales e índices de error.....	55
5.	Resultados e interpretación.....	59
5.1.	Resultados físico-químicos.....	59
5.2.	Resultados del tratamiento de irradiación.....	59
5.3.	Resultados del tratamiento de fotocátalisis.....	61
5.4.	Resultados del tratamiento de irradiación/H ₂ O ₂	62
5.5.	Resultados del tratamiento de fotocátalisis/H ₂ O ₂	64
5.6.	Resultados del tratamiento de O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂	66
5.7.	Resultados de ECM, R ² y Gráficas de la modelización cinética.....	67
7.	Conclusiones.....	85
8.	Bibliografía.....	89

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría dar las gracias a...

A mis padres por su cariño, confianza y apoyo incondicional.

A Jorge por enseñarme todo lo que he aprendido sobre microbiología y por el apoyo y la ayuda que me ha prestado para la realización de este proyecto fin de carrera.

A Rosa por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto y por su ayuda y disposición.

A Pilar por su inestimable ayuda en el día a día en el laboratorio.

A los compañeros de laboratorio por los buenos momentos vividos juntos, así siempre es más fácil y agradable trabajar y siempre me han ayudado en lo que les he necesitado.

Resumen

Los agentes patógenos transmitidos por el agua constituyen un problema que exige un control mediante la implementación de medidas de protección ambiental a fin de evitar el incremento de las enfermedades hídricas, (RD 140/2003). Según esta normativa, un agua se considera “apta para consumo humano” si no contiene ningún tipo de microorganismo o sustancia, en una cantidad o concentración que pueda suponer un peligro para la salud humana.

Los PAOs se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes. El concepto fue inicialmente establecido por Glaze (1987) y colaboradores, quienes definieron los PAOs como procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$).

El objetivo principal de este trabajo es evaluar los procesos avanzados de oxidación (PAOs), en este caso la combinación de fotocátalisis con otros oxidantes: luz, luz/ TiO_2 , luz/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$; y el estudio cinético de inactivación de la bacteria *Escherichia coli* en los diferentes tratamientos de desinfección aplicados. Además de comparar estos resultados con los obtenidos por Lanao (2012) sobre la bacteria *Enterococcus sp.*

El tratamiento más efectivo, en términos de desinfección, corresponde a aquel en el que se alcanzan valores de desinfección de 3.2 unidades logarítmicas como es el caso de la fotocátalisis.

Los mayoría de los resultados obtenidos se ajustan bien a los modelos cinéticos aplicados puesto que alcanzan el umbral mínimo de R^2 aconsejable de 0.95 y valores de ECM cercanos a 0.

1. Introducción y objetivos

El aumento de la actividad industrial y el consiguiente desarrollo económico y social han ido produciendo un crecimiento de las grandes ciudades que a su vez, ha ido haciendo más complejo el suministro de uno de los elementos indispensables para la vida, el agua. Habitualmente, los componentes aportados por el medio natural y el uso por parte del hombre generan una contaminación de estas aguas que impide una aplicación directa para un uso determinado sin la corrección previa de algunos de sus parámetros.

En función del uso que se haga del agua (abastecimiento, baño, reutilización, etc.) en muchas ocasiones es necesario aplicar tratamientos de desinfección para eliminar los contaminantes biológicos presentes y evitar enfermedades infecciosas ocasionadas por agentes patógenos presentes como bacterias, virus y parásitos.

La legislación responde al marco comunitario de actuación que establece la Directiva 2000/60/CE en política de aguas, en la que se defiende que el agua no es un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal. En consecuencia, se hace imprescindible realizar una correcta gestión del ciclo integral del agua que haga compatible su suministro a toda la sociedad con garantías de calidad.

El cloro es el desinfectante universalmente usado para tratar el agua por su efecto tóxico en bacterias nocivas y otros organismos causantes de enfermedades, y su efecto residual, no obstante, en 1974 Rook y Bellar descubren que tras el proceso de la cloración en aguas se forman compuesto órganohalogenados como los trihalometanos (THMs) y los

ácidos halogenados (tricloroacético y percloroacético) (Bueno, 1997), sustancias consideradas como peligrosas por la legislación vigente.

Ante esta problemática se plantea la aplicación de otros procesos de oxidación como son los Procesos de Oxidación avanzada (POA), cuyo finalidad es la generación de radicales hidroxilos (OH^\cdot), a partir del acoplamiento de oxidantes ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, etc.). En efecto, los POAs son variados, unos más eficaces que otros, dependiendo del compuesto orgánico a oxidar o patógenos a inactivar así como de las condiciones de aplicación.

Hay factores como: la turbidez, color del agua, concentración de los compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos como hierro, calcio..., formación de agregados de microorganismos, presencia de biofilms sobre la superficie de la lámpara; que pueden reducir la eficiencia del tratamiento.

El objetivo principal de este proyecto es estudiar la desinfección de aguas mediante procesos avanzados de oxidación (POAs), aplicables tanto como alternativa o como complementación a los procesos convencionales de desinfección, con el fin de obtener una buena calidad de las aguas tratadas.

Este objetivo principal se asienta sobre estos subobjetivos:

- A. Puesta en marcha de una metodología de preparación de una muestra fortificada. Identificación de *Escherichia coli*, germen patógeno objeto de estudio.
- B. Aplicación de Procesos de Oxidación Avanzada como tratamientos de agua alternativos de desinfección. Entre ellos se evalúan sistemas basados en irradiación, peróxido de hidrógeno

(H₂O₂), dióxido de titanio (TiO₂) y ozono (O₃), y así como combinaciones entre ellos: irradiación/H₂O₂, fotocátalisis (irradiación/TiO₂), fotocátalisis/H₂O₂ y, (O₃/H₂O₂/fotocátalisis).

- C. Estudio comparativo relativo a cinéticas de inactivación de otros microorganismos para los procesos seleccionados en este PFC.

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación "Evaluación de procesos en el tratamiento de aguas y fangos de EDARs, para la reducción de contaminantes con riesgo sanitario y ambiental (UZ2012-TEC-06)" financiado por el Banco Santander-Universidad de Zaragoza. Además, cuenta con la financiación DGA-FSE.

2. Control de la calidad de las aguas de abastecimiento

2.1.Desinfección de aguas

La desinfección se define como proceso mediante el cual se eliminan los microorganismos patógenos en el agua. Este proceso no solo debe inactivar a los microorganismos presentes en el agua, sino que también debe tener un efecto residual, lo que significa que debe mantener agentes activos en el agua tras la desinfección para prevenir el recrecimiento de los microorganismos en las tuberías provocando la recontaminación del agua.

Durante siglos y antes de los descubrimientos en microbiología, especialmente los estudios de Kock y Pasteur, debido a que se desconocían las causas y por las pésimas condiciones de higiene, las plagas infecciosas arrasaban con poblaciones enteras en Europa. Una vez demostrado que los microorganismos son la causa de las terribles enfermedades que causaban tantas muertes, se buscó la manera de evitar o disminuir la incidencia de contaminación de las aguas potables y sus fuentes, dando inicio a la ciencia de la higiene.

Uno de los primeros tratamientos implementados para tratar de evitar las enfermedades infecciosas transmitidas por el agua fue la sedimentación y filtración, que disminuyen la carga microbiana pero no garantizan la desinfección total.

En 1850 John Snow después de un ataque de cólera en Londres, implementó un sistema de desinfección por cloro para una fuente de abastecimiento en esta ciudad.

Sims Woodhead en 1897 con los antecedentes de Snow y tratando de dar alivio a una epidemia de tifoidea en Kent Inglaterra, también empleó cloro líquido para aliviar los estragos de la enfermedad.

Lo éxitos de estas experiencias hicieron que en Inglaterra se empleara la cloración como una medida preventiva de contaminación microbiológica del agua y posteriormente en 1908 en New Jersey en Estados Unidos se implementó la cloración como un proceso de tratamiento en la potabilización del agua, y se hizo evidente la disminución de incidencia de enfermedades infecciosas en los consumidores. En años posteriores se generalizó la desinfección del agua con cloro y sus derivados en todo el país y finalmente en todo el mundo.

Las aguas contaminadas, en general, son procesadas eficientemente por plantas de tratamiento biológico, por adsorción con carbón activado u otros adsorbentes, o por tratamientos químicos convencionales (oxidación térmica, cloración, ozonización, radiación solar, etc.). Sin embargo, en algunos casos estos procedimientos resultan inadecuados para alcanzar el grado de pureza requerido por ley o por el uso ulterior del efluente tratado. En estos casos y cada vez más crecientemente, se está recurriendo al uso de los llamados Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs). Los métodos pueden usarse solos o combinados entre ellos (radiación solar, radiación solar/H₂O₂, fotocátalisis , etc.), o con métodos convencionales.

2.2. Normas de calidad microbiológica en aguas

La Ley 14/1986 General de Sanidad establece la obligación de las Administraciones públicas sanitarias de orientar sus actuaciones prioritariamente a la promoción de la salud y la prevención de las enfermedades. Es por ello que las actividades y productos que, directa o indirectamente, puedan tener consecuencias negativas para la salud deben ser sometidos a un control sanitario. En lo que respecta al uso al cual va a

ir destinado un suministro de agua, las normas de calidad microbiológica exigidas son más o menos estrictas.

La Orden del 11 Mayo de 1988 relativa a las aguas prepotables establece la obligatoriedad de controlar coliformes fecales y totales, *Streptococcus* fecales y *Salmonella* spp. para clasificar las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en categoría A1, A2, A3 o peor que A3. Salvo el parámetro *Salmonella*, que tiene asociado un valor imperativo, el resto de parámetros microbiológicos cuentan con valores indicativos deseables.

La Directiva 2006/7/CE relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño establece obligatorio realizar el recuento de *E. Coli* y *enterococos*. En función de los resultados, el agua posee una calidad suficiente, buena o excelente.

En la Directiva 2006/113/CE sobre las aguas destinadas a la cría de moluscos, se establece la recomendación de realizar el control de coliformes fecales, para los cuales sólo hay valores guía. A pesar de ello, la legislación subraya que a la espera de una directiva relativa a la protección de los consumidores sobre esta clase de productos, ese valor debería ser obligatoriamente respetado en aquellas aguas en las que habiten los moluscos directamente comestibles.

En lo referente a la calidad exigida en las aguas aptas para peces, la Directiva 2006/44/CE no indica ningún parámetro microbiológico a controlar.

En el Real Decreto 140/2003, transposición al marco legislativo español de la Directiva 98/83/CE, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, se establecen como parámetros microbiológicos de obligado análisis *E. Coli*, *Enterococos* y *Clostridium perfringens* (incluidos los esporos). El recuento de colonias a 22 °C y de

coliformes son sólo parámetros indicadores. En el caso de incumplimiento de estos parámetros indicadores, la autoridad sanitaria valora la calificación del agua como “apta o no para el consumo humano” en función del riesgo para la salud.

Finalmente, el RD 1620/2007 establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. En función del uso al cual van a ir destinadas las aguas, se analizarán unos parámetros biológicos u otros. *E. Coli* y *nemátodos* (al menos los géneros *Ancylostoma*, *Trichuris* y *Ascaris*) deben ser analizados para todos los usos establecidos. El análisis de *Legionella* también es obligatorio para todos los usos de agua establecidos salvo para el uso ambiental, que no contempla su control. *Salmonella spp.* únicamente es contemplada en las aguas regeneradas con fines agrícolas e industriales. Por último, controlar *Taenia saginata* y *Taenia solium* es obligatorio si el agua se destina a regar pastos para consumo de animales productores de carne, ya que son los hospedadores intermediarios de estos parásitos.

2.3. Contaminación biológica

Se reconoce que el agua es uno de los principales vehículos transportadores de microorganismos causante de enfermedades provenientes del aparato digestivo del hombre y de otros animales. Los *coliformes* fecales son un grupo grande de microorganismos, habitantes usuales de los intestinos de los animales superiores.

Los microorganismos patógenos están relacionados con enfermedades específicas de transmisión hídrica. La fiebre tifoidea, las fiebres paratifoideas, la disentería bacteriana y el cólera son causadas por bacterias, la amibiosis o disentería amebiana por protozoarios, la

esquistosomosis por gusanos (helmintos) y larvas, en tanto que ciertos virus originan la hepatitis infecciosa y la poliomielitis.

Los indicadores de contaminación fecal se han elegido de acuerdo a los siguientes criterios:

- Ser fáciles de aislar y cultivar en el laboratorio.
- Ser relativamente inocuos para el hombre y los animales.
- Estar presentes en las heces de humanos y animales en grandes cantidades.
- No multiplicarse en aguas naturales.
- Persistir en el agua de manera similar a los patógenos fecales.
- El grado de eliminación durante el tratamiento del agua debe ser similar al de los patógenos.

La unidad de medida de la contaminación microbiológica es la UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Así, el valor de UFC por metro cúbico (UFC/m³), indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente.

Así pues, a continuación se detalla un resumen de las características principales de los microorganismos patógenos que pueden encontrarse en el agua : Virus , Protozoos y Bacterias.

2.3.1. Virus

Es una entidad infecciosa submicroscópica que sólo puede multiplicarse dentro de las células de otros organismos. Si no están alojados en una “célula huésped”, se encuentran en forma inactiva, además poseen una capa protectora. Su morfología varía desde espiral, esférica o como célula pequeñas.

Estos no se encuentran en el cuerpo humano de forma natural, a diferencia de lo que ocurre con las bacterias. Si un ser humano queda infectado por un virus, este generalmente se elimina por las heces en grandes cantidades, (*Madigan et al.*, 2003).

2.3.2. Protozoos

Los Protozoos, son organismos microscópicos, unicelulares Eucarionas, la mayoría de vida libre, aunque existen especies que son parásitas y viven de sus hospedadores.

Son heterótrofos, fagótrofos, depredadores o detritívoros, a veces mixótrofos (parcialmente autótrofos), según su alimentación. Viven en ambientes húmedos o directamente en medios acuáticos, ya sean aguas saladas o aguas dulces. La reproducción puede ser asexual por bipartición y también sexual por isogametos o por conjugación intercambiando material genético, (*Tortor et al.*, 1993).

2.3.3. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares de tipo procariótico, es decir, son organismos que solo se pueden observar al microscopio, constituidos por una sola célula autónoma, con membrana nuclear.

Su tamaño oscila entre 0,5 y 5 μm . Las bacterias pueden ser alargadas (bacilos), esféricas (cocos) o en forma espiral (espirilos). Se pueden asociar en grupos; cuando se agrupan por parejas se llaman diplococos, cuando forman cadenas bacterianas se llaman estreptococos y cuando se agrupan en racimos se llaman estafilococos.

Debido a su presencia en muchos tipos de agua, y a que es considerado como indicador fecal, así como su fácil control, cabe citar a la bacteria, *Escherichia Coli*, objeto de estudio en este proyecto, algunas de sus características más importantes son:

Es una bacteria facultativa, es decir, puede adaptarse para crecer y metabolizar tanto en presencia como ausencia de oxígeno. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo. La *E.coli* puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biología molecular. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram-negativo), no forma esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, (*Chris Bell et al., 1998*).

3. Procesos de desinfección

3.1. Procesos convencionales de desinfección

Existen diversos métodos para la desinfección del agua, entre los más importantes se encuentran: los agentes químicos (Cl_2 , O_3 , etc.), los medios mecánicos (filtración, sedimentación), y los agentes físicos (luz, calor).

Los agentes químicos son los más utilizados y deben ser tóxicos para los microorganismos, pero no nocivos para el hombre y los animales, ser solubles en agua o en el tejido celular, tener buena estabilidad, no ser corrosivos ni colorantes, manipulables sin grandes medidas de seguridad, estar disponibles en grandes cantidades a un precio razonable y ser fácilmente medibles y cuantificables en el agua.

La mayoría de los desinfectantes son fuertes oxidantes (Cl_2 , ozono, hipoclorito sódico, etc.) y/o generan a su vez especies oxidantes como subproductos, como los radicales libres hidroxilo, que reaccionan con los componentes orgánicos e inorgánicos del agua.

La actuación de los agentes desinfectantes sobre los microorganismos fundamentalmente se basa en dañar su organización estructural, interferir en el metabolismo enzimático, e interferir en la biosíntesis de componentes regenerativos (crecimiento celular) (EPA, 1999).

La efectividad de estos agentes depende de las condiciones bajo las que actúan:

A)-. Concentración: varía con el tipo de agente y de microorganismo, pues una misma concentración del agente puede producir un efecto diferente en distintos microorganismos.

B)-. Tiempo de contacto: los microorganismos no son susceptibles a un agente en la misma forma, por lo que no todos los microorganismos mueren al mismo tiempo. Los microorganismos

no mueren instantánea ni simultáneamente. La cinética de muerte de un tipo de microorganismos sigue una curva con pendiente constante en la que el número de microorganismos muertos en cada fracción de tiempo es un porcentaje constante del número de microorganismos vivos al comienzo del período. Si la población está constituida por varias especies la muerte ya no sigue un modelo logarítmico sino que la pendiente varía.

C)-. pH: afecta tanto a los microorganismos como a los agentes químicos. El aumento de pH por encima de 7 incrementa la carga negativa de los microorganismos afectando la concentración del agente sobre la célula. El pH determina el grado de disociación y la efectividad del agente químico, pues a menor disociación mayor permeabilidad y mayor efectividad.

D)-. Temperatura: normalmente al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes. Para muchos subir 10°C supone duplicarla tasa de muerte.

E)-. Influencia de sustancias presentes: la materia orgánica en el material a tratar afecta negativamente la actividad de los agentes químicos-oxidantes (hipoclorito) y los de los desnaturalizantes.

F)-. Espectro antimicrobiano: algunos microbios son más resistentes, por ejemplo el bacilo de la tuberculosis resiste mejor los hipocloritos que otras bacterias. Las especies esporuladas son más resistentes a algunos agentes químicos.

G)-. Estabilidad del desinfectante: los preparados desinfectantes son estables en sus formulaciones originales, sin diluir. Luego de la dilución se alteran gradualmente, por esa razón se recomienda usar diluciones recientes.

H)-. Resistencia microbiana: existe una natural resistencia en algunas especies o cepas, que se puede difundir por transmisión de genes.

Respecto a los medios físicos de desinfección, el método más utilizado es la radiación UV, proceso de desinfección convencional que no genera órgano-clorados e inactiva de manera muy eficaz patógenos como bacterias, esporos, virus e incluso protozoos resistentes como *Cryptosporidium* y *Giardia*.

El poder desinfectante de esta técnica dependerá de tres variables:

- ➔ Dosis de radiación absorbida por los microorganismos.
- ➔ Intensidad de la lámpara utilizada.
- ➔ Tiempo de exposición.

Como inconveniente, cabe destacar que este método de desinfección no tiene efecto residual.

3.2.Procesos avanzados de desinfección

3.2.1. Generalidades

Se basan en la generación de especies reactivas de oxígeno, especies químicas muy reactivas y de ataque muy poco selectivo, capaces de mineralizar los contaminantes y atacar a los microorganismos y contaminantes orgánicos presentes.

Los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), principal componente de las ROS son más fuertes que otros oxidantes tradicionales como el ozono, peróxido de hidrógeno, dióxido de cloro y cloro (tabla 1). Presentan un mayor potencial estándar de oxidación, por lo que su eficacia en la oxidación de

la materia orgánica está demostrada frente a otras especies menos reactivas como el ozono o el cloro.

Tabla 1. Potenciales estándar de oxidación

Especie	F ₂	•OH	O _{atómico}	O ₃	H ₂ O ₂	MnO ₄ ²⁻	Cl ₂	ClO ₂
E°(V,25°C)	3,03	2,08	2,42	2,07	1,76	1,67	1,36	1,15

Las diferentes posibilidades de generación de radicales ROS, dan nombre a varios procesos de oxidación avanzada, entre ellos, Fotocatálisis (radiación solar/TiO₂), Ozonización (O₃, O₃/UV y O₃/H₂O₂), luz ultravioleta (UV, H₂O₂/UV).

El principal problema de estas técnicas es el alto coste de los reactivos como el ozono y el peróxido de hidrógeno o las fuentes de energía como la luz ultravioleta y para reducir costes asociados al uso de radiación se pretende aprovechar la banda UV del espectro solar, es decir, utilizar la energía solar como fuente de fotones con el consiguiente ahorro energético y las ventajas medioambientales que ello supone.

Entre las ventajas de los procesos de oxidación avanzada frente a las técnicas convencionales de desinfección hay que destacar:

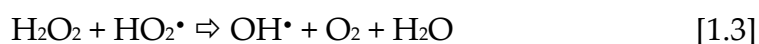
- Se mejoran las propiedades organolépticas del agua y no se generan lodos durante el proceso.
- En el caso de los POAs fotoquímicos, aumentan la velocidad de reacción en comparación con la misma técnica en ausencia de luz. Esto evita el uso de grandes tanques, reduciendo el espacio de los sistemas de tratamiento y aumenta la flexibilidad del sistema al permitir el uso de una variedad de oxidantes y condiciones de operación.

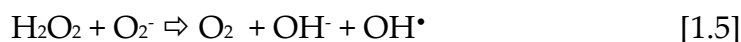
3.2.2. Radiación solar con H₂O₂

En este proceso tiene lugar dos mecanismos de acción; en primer lugar, una acción directa de la radiación solar sobre la membrana bacteriana de los microorganismos y en segundo lugar, un ataque oxidativo de la pared y membrana celulares por parte de radicales oxidativos generados, mayoritariamente radicales hidroxilo.

Después de que la molécula de H₂O₂ absorbe la luz, se produce la ruptura de su enlace peroxídico, según la ecuación [1.1], generándose los radicales hidroxilo, que participarán de manera activa en el fenómeno de desinfección. También está establecido que el H₂O₂ puede entrar en el interior de la célula y combinarse con iones de hierro intracelulares produciéndose una reacción Fenton.

A su vez, estos radicales hidroxilo pueden atacar al peróxido de hidrógeno, generándose una conjunto de reacciones secundarias en serie [1.2-1.4], entre la que destaca la combinación del peróxido de hidrógeno con el radical superóxido conocida como reacción Haber-Weiss, que aporta radicales hidroxilo adicionales [1.5], (*Rincón y Pulgarin, 2004; Mamane et al., 2007*).





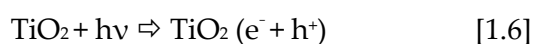
3.2.3. Fotocatálisis

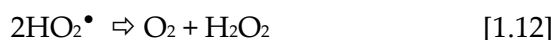
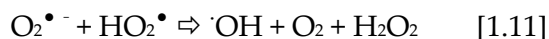
En procesos de fotocatálisis la generación de ROS tiene lugar por combinación de un catalizador y luz.

Numerosos trabajos de investigación avalan la efectividad de los procesos fotocatalíticos en la eliminación de compuestos altamente persistentes en agua como los pesticidas utilizados en la agricultura (*Ormad et al, 2010; Miguel, 2010*), antibióticos y otros fármacos (*Elmolla y Chaudhuri, 2009, 2010*) y microorganismos presentes en el agua (*Blake et al., 1999; Rincón y Pulgarin 2003, 2007; Chong et al., 2010*).

El catalizador semiconductor más estudiado en la actualidad en los tratamientos de radiación solar es el dióxido de titanio por sus características de alta fotoactividad, bajo coste, recuperación del catalizador, estabilidad química y biológica e inocuidad.

Esencialmente ocurre una promoción de electrones de la banda de valencia a la de conducción, lo que a su vez forma un hueco positivo en dicha banda de valencia, y estos interactúan con iones hidróxido y agua para formar el radical libre $\cdot\text{OH}$. Los electrones en la banda de conducción interactúan con el Oxígeno molecular para formar el radical Superóxido (O_2^-) y Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) que a su vez generan radicales $\cdot\text{OH}$.





La efectividad de la fotocatálisis se atribuye a la actuación de radicales hidroxilo y al resto de ROS. Estas especies radicalarias son capaces de generar estrés oxidativo sobre los microorganismos, siendo la pared externa celular la primera barrera defensiva al ataque de cualquier tipo de agresión. Una vez superada esta defensa, los radicales ROS atacan la membrana plasmática, compuesta por fosfolípidos y proteínas integrales. Progresivamente, aumenta la permeabilidad de la membrana lo que permite la liberación del contenido intracelular. La rápida pérdida de iones potasio va a influir en una reducción de la viabilidad celular, desequilibrando las funciones vitales y provocando la muerte de la bacteria. También las partículas de TiO_2 tienen vía libre para introducirse en las células dañadas, lo que lleva al ataque directo de los componentes intracelulares, acelerando su muerte (*Huang et al., 2000*).

Como resumen general hay que decir que debe existir un contacto directo entre el catalizador y el microorganismo, y un fenómeno de adsorción, para producirse la oxidación directa de los componentes celulares.

3.2.4. Fotocatálisis combinada con oxidantes

En los tratamientos fotocatalíticos, además del dióxido de titanio y la radiación solar, pueden adicionarse otros oxidantes auxiliares, como el peróxido de hidrógeno, o el peroxidisulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) para mejorar

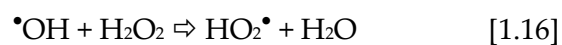
la eficacia del proceso (*Rincón et al., 2001, Rincón y Pulgarin, 2004; Kositzi et al., 2004*).

El H_2O_2 es una molécula de alto potencia redox (1,77V). Sus propiedades desinfectantes provienen de una acción directa molecular, pero en mayor medida de radicales libres formados en la catálisis.

Si se adiciona peróxido de hidrógeno al proceso fotocatalítico, el H_2O_2 participa junto con el oxígeno como aceptor de electrones en las reacciones redox que se producen sobre el catalizador [1.13], ayudando a evitar la recombinación de los pares electrón-hueco que pueden formarse en el proceso fotocatalítico, lo que conllevaría a unos resultados de desinfección inferiores [1.14].

El peróxido de hidrógeno también adsorbe directamente la radiación UV de la luz solar. Esta acción provoca una rotura de su enlace peroxídico, descomponiéndose en radicales OH y consecuentemente, incrementándose la destrucción de microorganismos presentes en el agua [1.15].

De manera negativa, si el H_2O_2 está en exceso, también puede participar como secuestrador de radicales OH o formar peroxocompuestos en la superficie del TiO_2 , perjudicando el proceso fotocatalítico, ya que estos últimos compuestos son menos reactivos [1.16] (*Kositzi et al., 2004*).



3.2.5. Ozonización/Fotocatálisis/H₂O₂

Si se utiliza el ozono como oxidante cabe destacar que además de reaccionar con las bacterias, oxida los sólidos en suspensión y los compuestos orgánicos e inorgánicos que el agua normalmente contiene, afectando a la eficacia de la ozonización (*Ireland, 1993*).

En el grupo de investigación “Calidad y tratamiento de las aguas” de la Universidad de Zaragoza se han realizado estudios donde se observa la influencia tratamientos combinados de ozono con peróxido de hidrogeno, sistema peroxona (O₃/H₂O₂), de ozono con dióxido de titanio (O₃/TiO₂) y ozono con dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno (O₃/TiO₂/H₂O₂), sobre *Enterococcus sp.* , y *Clostridium perfringens*.

4. Procedimiento experimental

4.1. Análisis microbiológico para *E. Coli*

4.1.1. Procedimiento normalizado

El cultivo y el recuento de *Escherichia coli* se llevan a cabo de acuerdo al método de filtración por membrana establecido en la Norma UNE-EN ISO 9308-1:2001. En primer lugar se filtra la muestra al vacío a través de membranas de celulosa estériles (Millipore®) de 0,45 µm de tamaño de poro y 47mm de diámetro. La muestra filtrada se coloca en una placa de Petri (agar MacConkey (Scharlau®)) y se incuba a 42 ± 2 °C, durante 24 ± 2 h. Pasado este tiempo, se realiza el recuento de las colonias rosas que se han formado y se lleva a cabo el test de tinción de Gram para confirmar algunas de ellas. El coeficiente de variación del método es del 15% aproximadamente. El recuento de colonias se expresa en (Unidades Formadoras de Colonias) por 100ml de muestra.

4.1.2. Medio de cultivo

Un medio de cultivo es un material nutritivo artificial preparado para el crecimiento de microorganismos en un laboratorio. Algunas de las bacterias pueden crecer en casi cualquier medio de cultivo; otras requieren medios especiales.

A la hora de cultivar una bacteria determinada el medio de cultivo tiene que satisfacer una serie de criterios. Debe contener los nutrientes adecuados para la bacteria específica que se desea desarrollar. También debe contener humedad suficiente, un pH ajustado y una concentración conveniente de oxígeno. El medio en el que se siembra debe ser estéril, es decir, en un principio no debe tener bacterias viables, de modo que el

cultivo tenga sólo las bacterias que se agreguen al medio. Por último, el medio de cultivo sembrado debe incubarse a la temperatura adecuada.

Se dispone de una amplia variedad de medios de cultivo para el crecimiento de bacterias en el laboratorio. Casi todos esos medios están deshidratados y sólo precisan el agregado de agua y un proceso de esterilización.

Cuando se desea que las bacterias se desarrollen sobre un medio sólido se agrega un agente solidificante como el agar. Es un polisacárido complejo proveniente de un alga marina. Posee algunas propiedades muy importantes que lo convierten en valioso para la microbiología. Pocos microorganismos pueden degradarlo, de modo que permanece en estado sólido. Se licua a una temperatura de alrededor de 100°C. Para el uso en laboratorio se mantiene en baños de agua a 50°C.

Este agar es selectivo de *E.Coli* y por lo tanto tiene inhibido el crecimiento de otras bacterias. La composición de este agar es la que figura en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de agar MacConkey.

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
Peptona	20
Lactosa	10
Sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5
Rojo neutro	0.03
Violeta cristal	0.001
Agar	15

Para preparar este medio de cultivo es preciso diluir 51,5 gramos del medio deshidratado en un litro de agua y llevarlo a ebullición. Tras someterlo al proceso de esterilización en el autoclave, se vierte el medio fundido en placas Petri y una vez solidificado se conservan en la nevera hasta su utilización.

4.1.3. Equipos de laboratorio

Los equipos utilizados para la experimentación desarrollada en esta investigación son los siguientes:

- Mechero Bunsen.
- Vórtex agitador.
- Contador de Colonias electrónico (Interscience Scan 100).
- Estufa incubadora (Selecta Incubidit 36 L).
- Autoclave (Selecta, Presoclave II 50).

4.1.4. Diluciones decimales seriadas

El volumen de agua a filtrar depende de la concentración bacteriana de la muestra. El volumen recomendado por el RD 140/2003 es 100 mL, pero en aguas naturales sin tratar, el número de bacterias en este volumen puede variar desde pocas decenas hasta cientos de millares, lo que impediría en este último caso un recuento adecuado de las colonias. Por tanto, como no se conoce de antemano la concentración microbiológica presente en la muestra de agua a analizar, se realizan diluciones de la muestra inicial.

A partir del agua natural (dilución 0), se toma 1 mL de la muestra con micropipeta y se transfiere a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0,9 % NaCl, estéril. A continuación, se homogeniza en un vortex, obteniéndose

de esta forma la dilución 1:10 (o dilución -1). Para hacer las diluciones sucesivas, se toma 1 mL de la dilución precedente bien homogeneizada y se lleva a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0,9% NaCl, todo ello en ambiente de trabajo estéril, proporcionado con un mechero Bunsen. La Figura 1 refleja el procedimiento de diluciones decimales seriadas de manera gráfica y la Figura 2 el aspecto de las placas de Petri después de la siembra de dichas diluciones.

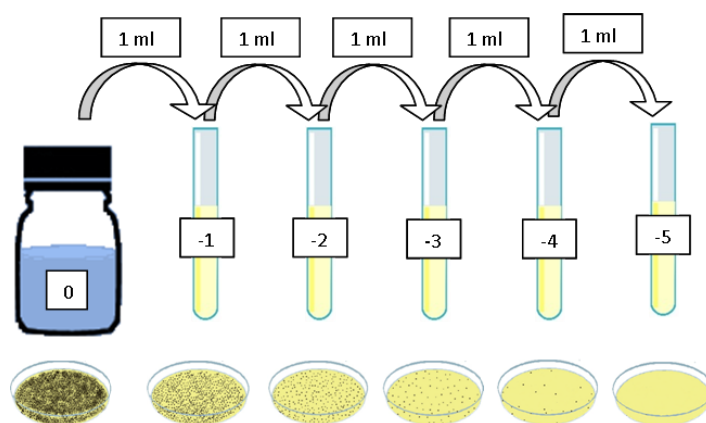


Figura 1. Procedimiento de diluciones decimales seriadas.

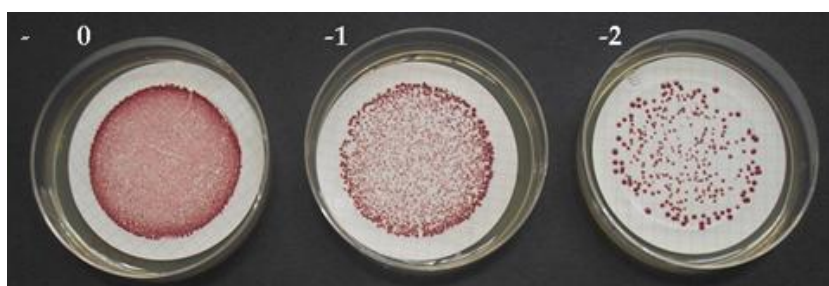


Figura 2. Aspecto de las placas de Petri después de la siembra de las diluciones decimales de una muestra de agua (de la más concentrada 0 a la más diluida -2).

4.1.5. Métodos de filtración por membrana e incubación

Para llevar a cabo la cuantificación y recuento de células viables de *Escherichia coli* presentes en la muestra de agua se puede llevar a cabo mediante dos métodos diferentes:

- a) Método en placa difusa (MPD)
- b) Método de Filtración por membrana (MFM)

a). Método en placa difusa (MPD):

Para llevar a cabo la siembra se pipetea sobre la superficie del agar dispuesto en la placa el volumen de muestra o de dilución deseada (20 - 500 μ L) y a continuación se extiende de forma homogénea por toda la superficie de la placa con ayuda de un asa Drigalsky. Ante el desconocimiento de la concentración exacta de bacterias en la muestra de agua, se siembran varias placas con diferentes volúmenes y diluciones con el fin de asegurar una placa adecuada para el recuento final. Este modelo de análisis se utiliza cuando se espera una concentración de bacterias superior a 600 UFC 100 mL⁻¹. Una vez ya se ha extendido la muestra por el Agar uniformemente se procede a la incubación de las placas de Petri en la estufa durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 42 ± 2 °C según establece la norma (UNE EN ISO 9308-1:2000), (Figura 3).

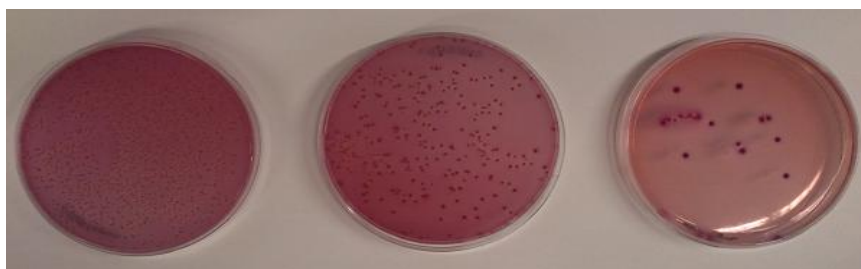


Figura3. Colonias de *E. Coli* en placas petri después de la incubación

b).Método de Filtración por membrana (MFM)

Se trata de una de las herramientas más versátiles en el análisis microbiológico del agua. El uso del MFM permite examinar grandes volúmenes de aguas en los que la concentración esperada de bacterias es inferior a 600 UFC.L-1.

En primer lugar se realiza la limpieza del soporte de filtración, para ellos se flamea el soporte con ayuda de un mechero Bunsen. A continuación, con ayuda de unas pinzas estériles se coloca el filtro con un diámetro de poro de 0,45 μm en el soporte y se adapta el embudo. El siguiente paso sería humedecer el filtro con suero fisiológico (NaCl 0,9 %) dejando pasar una cierta cantidad de suero a través del filtro y dejando el resto dentro del embudo para pasar a continuación la muestra original a filtrar. Por último se coge el filtro con las pinzas estériles y se transfiere a la placa Petri. Con el objetivo de asegurar la obtención de placas con un número apropiado de colonias para el recuento (entre 20 y 200 UFC.L-1) se filtran varios volúmenes.

Cuando ya se ha depositado el filtro en la placa Petri se procede a incubar las placas de Petri en la estufa durante 24 ± 2 horas a una temperatura de 42 ± 2 °C según establece la norma (UNE EN ISO 9308-1:2000), (Figura 4).

El método de filtración es un método más sensible ya que se filtra más cantidad de muestra y se detectan mejor las bacterias.



Figura 4. Colonias de *E. coli* en filtro con un diámetro de poro de 0,45 μm .

4.1.6. Recuento e inactivación

Transcurrido el tiempo de incubación, se procede al recuento de las placas de Petri. Para facilitar la labor del recuento se utiliza un contador de colonias (Interscience Scan 100) provisto de una luz que retroilumina la placa y permite una mejor visualización de las colonias y de esta forma poderse contar con más exactitud.

Tras seleccionar las placas con crecimiento adecuado, el recuento bacteriano se obtiene aplicando la ecuación [1.17], donde F_d es el factor de dilución, es decir, la inversa de la dilución seleccionada.

$$\frac{\text{UFC}}{100 \text{ mL}} = \frac{\text{UFC}}{\text{mL muestra filtrado}} \cdot 100 \text{ mL} \cdot F_d \quad [1.17]$$

4.2. Preparación de muestras fortificadas

Las muestras a fortificar son aguas reales procedentes del Canal Imperial de Aragón. La toma de las muestras se realiza en noviembre de 2012, a la altura de Rosales del canal (Zaragoza). Se utilizan frascos recolectores estériles y tras recoger las muestras, se mantienen a una temperatura inferior a 10 °C hasta llegar al laboratorio. Una vez allí, se

analizan sus parámetros físico-químicos y se procede a conservarlas a -20°C hasta su posterior utilización.

Las muestras se fortifican hasta alcanzar concentraciones en el rango de 10^5 a 10^7 , ya que si se dan concentraciones demasiado bajas, no se podrá determinar la influencia de los tratamientos de desinfección de estudio.

Para ello, previamente a la realización de cada uno de los tratamientos de estudio, la muestra de agua que va a ser utilizada se esteriliza en una botella de vidrio Pyrex de 1 L para eliminar las bacterias presentes en el día del muestreo y que hayan podido sobrevivir al periodo de congelación y así evitar cualquier interacción de la bacteria de estudio con otros microorganismos (*Medema et al.*, 1997). Posteriormente, a partir de cultivos puros de *E. Coli*, se preparan suspensiones bacterianas concentradas que posteriormente se añaden a las muestras de agua natural

La fortificación se lleva a cabo en una atmósfera inerte creada mediante un mechero Bunsen y de esta forma no contaminar las muestras. Una vez añadidas las bacterias a los recipientes ya tendríamos preparadas las muestras y podríamos comenzar con los experimentos.

4.3. Metodología de análisis de parámetros físico-químicos

La Tabla 3 muestra la metodología normalizada de análisis de los parámetros físico-químicos utilizados en la caracterización de las muestras analizadas durante los tratamientos estudiados, así como la instrumentación relacionada, el rango de medida y el error de dicha instrumentación.

Tabla 3. Parámetros físico-químicos analizados en este proyecto.

<u>Parámetro</u>	<u>Método</u>	<u>Equipo</u>	<u>Marca y modelo</u>	<u>Rango</u>	<u>Error</u>
pH	4500-HB Standard Methods	pH-metro	CRISON GLP 21	1-14	± 0.02
Turbidez	ISO 7027	Turbidímetro	HANNA Instruments LP 2000	0-1000 UNT	± 0.5 UNT
Conductividad	UNE-EN ISO 27888	Conductímetro	CRISON Basic 30	0.01-19999 μ S/cm	± 0.02 μ S/cm
Sólidos en Suspensión	2540D Standard Methods	Espectrofotómetro	Hach LANGE DR 2800	5-750 mg/l	± 0.1 mg/l

4.4.Experimentos de fotocátalisis

4.4.1. Materiales y reactivos

Los materiales y reactivos utilizados para la experimentación desarrollada en este PFC son los siguientes:

- Ácido sulfúrico: H_2SO_4 96%, calidad para análisis, marca Panreac.
- Hidróxido de sodio: disolución NaOH 0,01N, marca Scharlau.
- Cultivo joven y puro de *E. Coli*.
- Agua destilada.
- Recipientes de Borosilicato de 1000 mL.
- Embudos estériles para el equipo de filtración en membrana (Millipore)
- Rampa de Filtración (Millipore)

- Filtros d membrana (Millipore, 0,45 μm diámetro de poro).
- Agar MacConkey (Scharlau).
- Micropipetas diferentes volúmenes.
- Cámara solar, ATLAS, Sun test CPS+ (figura 5), (lámpara de xenon que emite luz a una longitud de onda entre 320 y 800 nm y con un Filtro especial de ventana, simulando la luz solar natural).



Figura 5: Cámara solar utilizada.

4.4.2. Agentes de reacción

- **Radiación UV/visible**

La irradiación utilizada en los tratamientos en la que es necesaria una fuente de irradiación procede de una cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS+ equipada con una lámpara de xenón, cuyo intervalo de intensidad se sitúa entre 250-765 W m^{-2} . Mediante dos filtros que cubren la lámpara de xenón, un filtro de cuarzo y un filtro adicional de ventana (Xenochrome 320), se consigue la emisión en un rango de radiación entre 320-800nm, el utilizado en los tratamientos de desinfección del presente PFC.

Las muestras que son tratadas se colocan en el interior de la cámara solar. Con un agitador magnético, se proporciona a la muestra un medio aireado y una mezcla perfecta durante los experimentos. La cámara

también está equipada con un regulador de intensidad y de tiempo de exposición, además de un control de temperatura. La intensidad de la irradiación seleccionada para todos los experimentos es de 500 W m^{-2} , que corresponde al 50% de la intensidad de la radiación solar natural al medio día y es utilizada por diversos autores en sus estudios, (Rincón y Pulgarin, 2003; Ibarz, 2008).

- **Dióxido de titanio**

El catalizador utilizado en los experimentos se prepara a partir de TiO_2 comercial (>98% anatasa, Panreac). Concretamente se utilizó el TiO_2 "P25 Degusa". Se adiciona una cantidad de 0,2 gramos en cada reactor de 0,2 L en el momento de inicio del experimento.

- **Peróxido de hidrógeno**

El peróxido de hidrógeno comercial utilizado en los experimentos de irradiación es de la marca Carlo Erba y tiene una concentración del 30% (v/v). Se adiciona una cantidad de $0,91 \mu\text{L}$ en cada reactor de 0,2 L en el momento de inicio del experimento.

- **Ozono**

El oxígeno se aporta desde una botella de gas comprimido conectada directamente al ozonizador (1). La generación de ozono aumenta con el caudal de oxígeno introducido, por lo que se regula el flujo mediante una válvula situada en el frontal del equipo. Entre la botella de gas y el ozonizador, se coloca un lecho de sílica gel (2) que debido a sus propiedades higroscópicas elimina la humedad de la corriente de O_2 antes de entrar en el ozonizador (3), ya que el gas de entrada siempre debe estar seco. El ozonizador se conecta a un reactor cerrado de vidrio (4) que

funciona en régimen semicontinuo, continuo respecto al gas y discontinuo respecto al líquido. Este reactor es de vidrio Pyrex con forma esférica y una capacidad de 3 L. El ozono gas se trasfiere a la muestra por la parte superior del reactor a través de un difusor poroso (O_3 introducido). La transferencia del ozono al agua produce un burbujeo que proporciona agitación a la muestra, favoreciendo el contacto ozono-agua. El ozono introducido se mantiene constante a lo largo de cada experimento.

Como todo el ozono producido no llega a consumirse en la reacción, el exceso debe destruirse (O_3 no consumido). Para ello se conectan en serie al reactor dos o tres borboteadores (5) que contienen una disolución de yoduro potásico al 2%. El ozono reacciona con el yoduro reduciéndose a oxígeno y liberándose a la atmósfera. El experimento debe llevarse a cabo en una campana de extracción ya que el ozono es un elemento tóxico. En la figura 6 se observa la instalación utilizada en la ozonización.

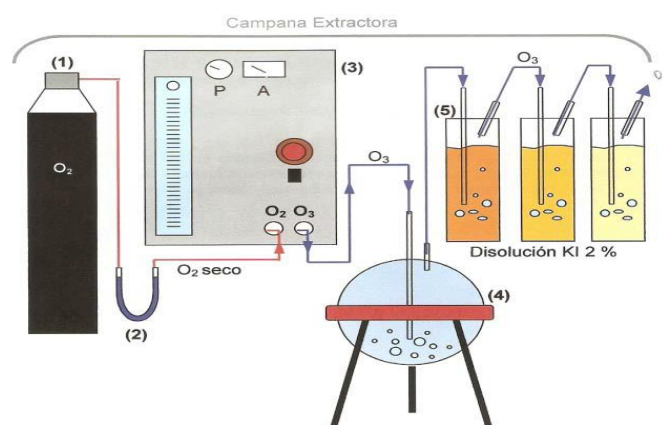


Figura 6. Descripción de la instalación de ozonización.

4.4.3. Condiciones de operación

Es importante destacar que todo el material de vidrio y los medios de cultivos son preparados en el autoclave a 121 °C y 1 bar de presión durante 15 minutos para lograr su completa esterilización.

La duración máxima de los experimentos de irradiación, irradiación/H₂O₂, fotocátalisis y fotocátalisis/H₂O₂ es de 30 minutos, mientras que para el experimento de ozonización/fotocátalisis/ H₂O₂ es de 10 minutos.

El rango de trabajo utilizado para la fuente de radiación corresponde al intervalo 320-800 nm, comprendiendo los rangos UVA y visible del espectro solar, a través del uso conjunto del filtro de cuarzo y el filtro de ventana.

Los ensayos se realizan por duplicado. Los reactores se introducen en la cámara solar, siempre en agitación.

Los experimentos se realizan a temperatura ambiente (23°C) y las temperaturas máximas que se alcanzan durante los tratamientos son 29-30°C. Está bien establecido que parte de la inactivación bacteriana en estudios de desinfección solar se debe a un incremento en la temperatura de las muestras (40-45°C) (*McGuigan et al., 1998*); sin embargo, la temperatura más alta alcanzada en los experimentos realizados es muy inferior, siendo el grado de desinfección atribuido a este factor despreciable.

El caudal de oxígeno seleccionado para el ensayo con el ozono es de 50 L h⁻¹ y la dosis de ozono generada con este caudal de oxígeno es de 289 mg O₃ h⁻¹.

El volumen de la muestra a tratar es 0,75 L y el ensayo también se realiza a temperatura ambiente (23 °C).

En los tratamientos en los que participa el catalizador TiO_2 , para favorecer una mezcla perfecta de la muestra en el reactor, se introduce un imán magnético que evita que el TiO_2 se deposite en el fondo durante el experimento. La concentración de TiO_2 utilizada en los tratamientos en los que participa es de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Concentraciones muy elevadas del catalizador pueden dar como resultado la saturación del medio y con ello, una menor efectividad en la desinfección con radiación solar, ya que la luz no puede penetrar fácilmente en el agua y tanto la actividad del catalizador como la acción directa de la luz ven disminuidos su efecto. *Maness (1999)* obtiene como concentración más efectiva de TiO_2 para la eliminación de *E. Coli*, mediante fotocátalisis, el valor de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A lo largo del desarrollo de los experimentos, se toman muestras a diferentes intervalos de tiempo con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos. En las muestras provenientes de los tratamientos en los que participa el H_2O_2 , cuya dosis inicial es $0,04 \text{ mM}$ ($1,365 \text{ mg H}_2\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), su dosis residual se neutraliza con “catalasa” con el objeto de anular su efecto bactericida. Esta se prepara en el laboratorio, adicionando 10mg de catalasa sólida, sobre 100 ml de agua Mili-Q.

4.5. Procedimiento para determinación de cinéticas

Los resultados obtenidos durante los tratamientos de irradiación, irradiación/ H_2O_2 , fotocátalisis, fotocátalisis/ H_2O_2 y $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ se analizan a través de 3 modelos matemáticos, el modelo de Hom, el modelo bifásico y el modelo de Mafart.

Se suministra o bien ozono o bien de aplica irradiación de manera continua y constante al reactor que alberga la muestra, por lo que se

considera que la concentración de ozono o el suministro de irradiación aplicada es constante, mostrando consonancia con los fundamentos del modelo de Hom el cual no asume una disminución del desinfectante a lo largo del tratamiento, sino habría de haberse aplicado en modelo cinético de Hom modificado.

4.5.1. Modelos cinéticos

La microbiología predictiva es una parte esencial de la microbiología que pretende conocer la respuesta de las poblaciones microbianas frente a diversas condiciones ambientales o tratamientos. Combina conocimientos de diferentes disciplinas (matemáticas, microbiología, ingeniería y química) con el objetivo común de desarrollar modelos matemáticos que describan y permitan predecir el ritmo de inactivación de los microorganismos de una determinada población, sometidos a condiciones tecnológicas o medioambientales determinadas (*Gómez, 2005*).

Dentro de los tipos modelos matemáticos existentes, este estudio de investigación se centra en los modelos de inactivación, modelos que estudian el ritmo de mortandad de las poblaciones bacterianas a lo largo de un proceso. La inactivación bacteriana en aguas ha sido bastante estudiada en la última década aplicando una gran variedad de modelos cinéticos de desinfección. La modelización cinética nace con la finalidad de simplificar e idealizar fenómenos complejos (*Lee y Nam, 2002*). Con ella se consigue obtener una expresión matemática que facilite el diseño adecuado de un sistema de desinfección.

La Tabla 4 recoge los modelos matemáticos propuestos para describir las gráficas de inactivación obtenidas en el presente trabajo de investigación. La selección de estos modelos se realiza en base al principio

de parsimonia según el cual los modelos han de ser tan simples como sea posible, es decir, con el menor número de parámetros posible (Gómez, 2005). La bondad del ajuste puede mejorar en gran medida añadiendo más parámetros al modelo; sin embargo, en ocasiones, aumentar mucho el número de parámetros puede llevar a que las predicciones no tengan sentido.

Tabla 4. Modelos cinéticos de estudios aplicados.

Modelo cinético	Ecuación integrada	Coefficientes cinéticos	Referencias
Modelo de Hom	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m = -K \cdot t^m$	K, n, m	Hom, 1972
Modelo bifásico	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = \text{Log} [P \cdot e^{-k_1 t} + (1 - P) e^{-k_2 t}]$	P, k ₁ , k ₂	Pruitt y Kamau, 1993
Modelo de Mafart	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p$	δ, p	Mafart et al., 2002

Modelo de Hom (1972)

Hom, tras analizar los resultados de diversos experimentos de cloración sobre sistemas algales-bacterianos y observar que respondían a cinéticas curvilíneas más que a lineales, generalizó de manera empírica la ley de Chick-Watson mediante la ecuación [1.18], donde k es la constante de velocidad de inactivación de primer orden, C es la concentración del desinfectante, n el coeficiente de dilución y m una constante empírica del modelo (Li, 2004; Méndez et al., 2008). En el caso de que la concentración sea constante, el modelo se simplifica integrándose esta concentración en una constante de velocidad aparente ($k_{ap} = k \cdot C^n$) dando lugar a la

ecuación [1.19], siendo esta k_{ap} una constante de pseudo-primer orden (min^{-1}) (Malato *et al.*, 2009).

Este modelo no considera que el agua tenga una demanda de desinfectante y por tanto, que la concentración del mismo disminuya a lo largo del tratamiento (Haas y Joffe, 1994).

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot m \cdot C^n \cdot N \cdot t^{m-1} \Rightarrow \text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m \quad [1.18]$$

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -k_{ap} \cdot t^m \quad [1.19]$$

El nivel de inactivación predicho por el modelo de Hom es una función no lineal de C y t , que dependen de los parámetros del modelo n y m , respectivamente. Este modelo se simplifica al modelo Chick-Watson para $n=1$ y $m=1$. Cuando m es menor que la unidad, se visualiza un efecto de cola o tailing-off.

Modelo bifásico de Pruitt y Kamau (1993)

En 1993, Pruitt y Kamau establecen un modelo bifásico basado en la existencia de dos poblaciones microbianas que presentan una sensibilidad al tratamiento diferente, siguiendo en ambos casos una cinética de inactivación de primer orden. La expresión matemática del modelo se define por la ecuación [1.20], donde P significa la fracción de microorganismos supervivientes correspondientes a la subpoblación 1, $(1-P)$ es la fracción de supervivientes de la subpoblación 2, k_1 representa la constante de inactivación de la población sensible y k_2 es la constante de inactivación de la población resistente.

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = \text{Log} \left[P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1 - P) e^{-k \cdot t} \right] \quad [1.20]$$

Modelo de Mafart (2002)

Peleg y Cole (1998) proponen el uso de distribuciones estadísticas tipo Weibull para desarrollar modelos que incluyan tanto cinéticas convexas, con un periodo inicial sin aparente inactivación, como cóncavas en las que no se consigue una inactivación completa. La distribución de Weibull es una distribución de probabilidades diseñada para describir el comportamiento de sistemas que tienen cierto grado de variabilidad.

El modelo asume que la inactivación microbiana se debe a la incapacidad de la célula para resistir las duras condiciones impuestas por algún tipo de estrés, después de cierto tiempo; también asume que la población es heterogénea, es decir, que cada célula tarda un tiempo diferente en morir. En definitiva, es un modelo que implica la existencia de una distribución de resistencias dentro de la población microbiana. La resistencia sigue una distribución de probabilidad de Weibull, definida por la ecuación [1.21].

Mafart (2002) modifica la ecuación Weibull según la ecuación [1.22], donde δ es el parámetro de escala y se corresponde con el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población bacteriana y p es el parámetro de forma e indica la forma de la curva de la ecuación, ya que ésta toma formas convexas cuando n es mayor que 1 y cóncavas cuando es menor que 1.

Este modelo se fundamenta en modelos de inactivación termal, ya utilizado para describir perfiles de desinfección sobre diferentes tipos de

microorganismos, fotorreactores y parámetros operacionales en fotocatálisis (Boyle *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009).

$$f(t) = \frac{n}{b} \left(\frac{t}{b} \right)^{n-1} e^{-\left(\frac{t}{b} \right)^n} \quad [1.21]$$

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad [1.22]$$

4.5.2. Ajuste de datos experimentales e índices de error

Para obtener los coeficientes cinéticos de cada modelo descritos anteriormente, es necesario ajustar los valores experimentales a las correspondientes ecuaciones mediante técnicas de regresión no lineal. Los parámetros de los modelos se ajustan a ecuaciones mediante algoritmos interactivos basados en el método de los mínimos cuadrados (Pernistky *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2003). En la actualidad, muchos programas informáticos estadísticos permiten realizar estos ajustes. Entre ellos, en este trabajo experimental se utiliza la herramienta Solver y la herramienta de GInaFiT del programa Microsoft Excel (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool).

Para evaluar la calidad de los ajustes de los modelos a los datos experimentales obtenidos se utilizan dos índices: el coeficiente de determinación (R^2) y el error cuadrático medio (ECM). También se utiliza con este propósito la representación gráfica de los valores estimados frente a los obtenidos experimentalmente.

El coeficiente de determinación, R^2 , se utiliza como una medida global de la calidad del ajuste. Este coeficiente informa sobre la proporción de variabilidad total de la variable dependiente que es explicable por el modelo. Cuanto más cercano sea el valor R^2 a 1, mejor es la precisión

predictiva del modelo, y por tanto, más concuerdan los valores predichos con los valores observados. La ecuación del coeficiente de determinación viene determinada por la ecuación [1.23], donde \tilde{y}_i son los valores estimados \bar{y} es la media de los valores reales (Gómez, 2005).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad [1.23]$$

El error cuadrático medio, ECM, se define como la raíz cuadrada de la media del cuadrado de los residuos (diferencia entre los valores observados y los valores estimados) y viene determinado por la ecuación [1.24], donde n es el tamaño de la muestra. Un valor de ECM igual a 0 indica que existe un perfecto acuerdo entre los valores predichos y los valores reales.

$$ECM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - y)^2}{n}} \quad [1.24]$$

Para comparar modelos diferentes se representan gráficamente los valores observados frente a los valores estimados. Si el modelo se ajusta perfectamente a los datos, los puntos se encuentran distribuidos a lo largo de la línea de equivalencia. La bondad del modelo será mayor cuanto más próximos estén los puntos a dicha línea (Gómez, 2005).

El cálculo de estos parámetros, R^2 y ECM, se realiza con el programa Excel 2007 (Microsoft).

Los modelos matemáticos aplicados en este proyecto son modelos primarios y como tales, describen cómo varía el recuento de las poblaciones bacterianas respecto al tiempo. Son ecuaciones matemáticas

que describen el cambio de una respuesta, que en este caso son las unidades logarítmicas de inactivación, a lo largo del tiempo y bajo unas condiciones determinadas.

5. Resultados e interpretación

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos recomienda una reducción de 4 logaritmos para virus y de 3 logaritmos para la *Giardia* y de 6 logaritmos para la *E.Coli* (para esta última se puede tomar como desinfección relevante con valores entorno a 3,6 logaritmos), (USEPA, 2004).

5.1.Resultados físico-químicos

En la tabla 5 se muestran los resultados de pH, turbidez, conductividad y sólidos en suspensión totales (SST) de valores los medios para el agua tratada tanto antes como después del los ensayos de Irradiación, Irradiación/ H₂O₂, Fotocatálisis, Fotocatálisis/ H₂O₂ y O₃/TiO₂/H₂O₂.

Tabla 5. Resultados de parámetros físico-químicos.

<u>Experimentos</u>	<u>Iniciales</u>				<u>Finales</u>			
	pH	Turbidez	Conduct.	SST.	pH	Turbidez	Conduct.	SST.
Irradiación	7,42	6,85	1.306	2	8,22	4.43	1.316	2
Irrad./ H ₂ O ₂	7,81	92	1104	19	8.25	97	2.005	23
Fotocatálisis	8,11	103	1200	20	8,23	1000*	1.364	716
Fotocat./H ₂ O ₂	7,77	79	1894	60	8,1	1000*	2.002	1.318*
O ₃ /TiO ₂ /H ₂ O ₂	7,68	5,49	894	9	8,02	87	1253	71

(*) → se encuentran por encima del rango de medida.

5.2.Resultados del tratamiento de irradiación

La Tabla 6 muestra los recuentos bacterianos obtenidos durante el proceso de irradiación. La Figura 7 representa la curva de inactivación de la bacteria *E. Coli*, a lo largo del tratamiento de irradiación. En esta gráfica

se representa la inactivación en unidades logarítmicas frente al tiempo, en minutos.

Tabla 6. Recuento de E.Coli durante irradiación.

Tiempo(minutos)	0	5	10	15	20	25	30
Recuento (N_t)	5,35E+05	3,76E+05	3,37E+05	3,16E+05	2,32E+05	2,02E+05	8,55E+04

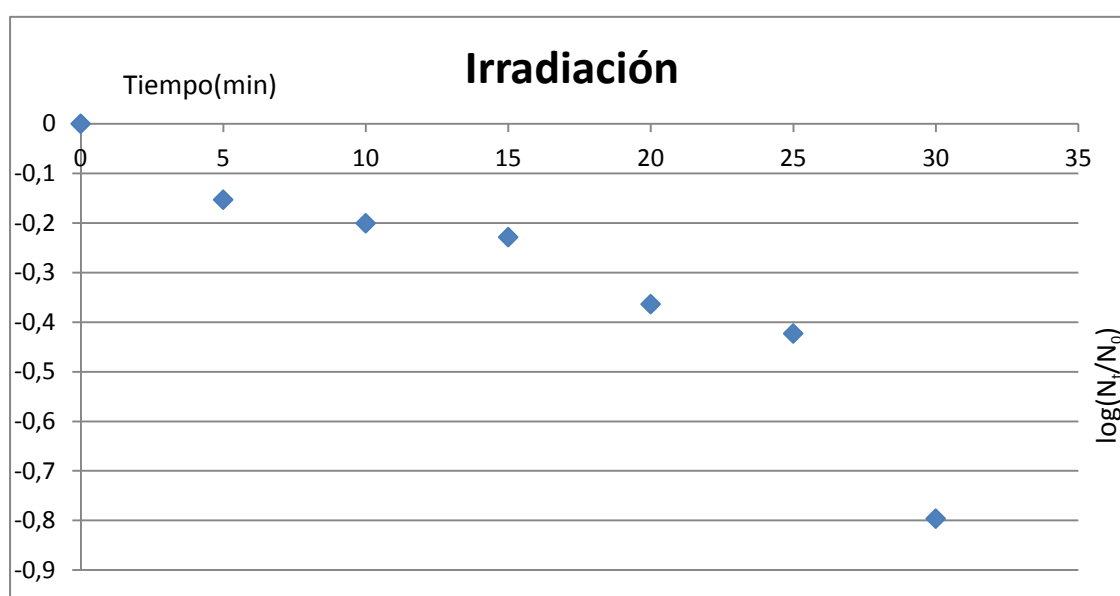


Figura 7. Inactivación de la bacteria E.Coli durante el tratamiento de irradiación.

Se obtiene una reducción poblacional de 0.8 unidades logarítmicas al final del experimento.

Si se compara con otros estudios llevados a cabo se observa que Lanao (2012) obtiene resultados de inactivación de *C. perfringens* en la misma matriz acuosa y aplicando el mismo tratamiento de 1.2 unidades logarítmicas en su forma vegetativa y de 0.2 unidades logarítmicas en su forma de esporos, esto nos muestra que la forma esporulada es más resistente, y casi no le afecta el tratamiento aplicado. También aplica el mismo tratamiento, en mismas condiciones sobre las poblaciones

bacterianas de *Enterococcus sp* donde alcanza un resultado de inactivación de 0.3 unidades logarítmicas.

5.3.Resultados de los tratamientos de fotocatálisis

La Tabla 7 muestra los recuentos bacterianos obtenidos durante el proceso de fotocatálisis. La Figura 8. Representa la curva de inactivación de la bacteria *E. Coli*, a lo largo del tratamiento de fotocatálisis. En esta gráfica se representa la inactivación en unidades logarítmicas frente al tiempo, en minuto.

Tabla 7. Recuento de *E.Coli* durante fotocatálisis.

Tiempo(min.)	0	5	10	15	20	25	30
Recuento(N_t)	8,20E+06	3,85E+06	5,00E+05	3,35E+04	2,18E+04	1,22E+04	5,20E+03

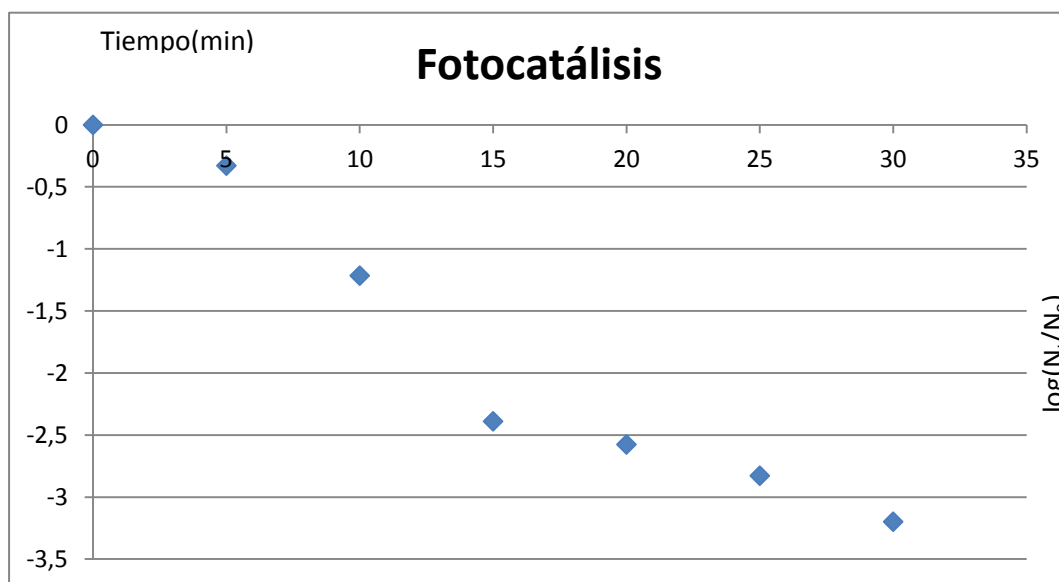


Figura 8. Inactivación de la bacteria *E.Coli* durante el tratamiento de fotocatálisis.

Cuando el TiO_2 se activa con la presencia de radiación solar, se consigue alcanzar un nivel de inactivación sobre la bacteria *E. Coli* de 3.3

unidades logarítmicas, 2.5 veces superior al nivel alcanzado por la luz por sí sola.

En el rango de irradiación aplicado ($>320\text{nm}$), se detecta claramente que la luz, por si sola, tiene un pobre efecto desinfectante, sin embargo, la actuación conjunta del TiO_2 y la irradiación produce una mejora esencial en la desinfección ya que el TiO_2 se activa a longitudes de onda inferiores a 385 nm , generándose en su superficie precursores de radicales OH, entre otros ROS, que aumentan el estrés existente sobre las bacterias. Rincón y Pulgarin (2003) establecen que la generación de una mayor cantidad de radicales ROS en el tratamiento de fotocatalisis excede los mecanismos de protección que inicialmente desarrollan las células para combatir la agresión, deteriorándose más rápidamente.

En este caso, Lanao (2012) obtiene resultados de inactivación de *C. perfringens* en la misma matriz acuosa y aplicando el mismo tratamiento de 5.9 unidades logarítmicas en su forma vegetativa y de 1.3 unidades logarítmicas en su forma de esporos, esto nos muestra que la forma esporulada es más resistente. También aplica el mismo tratamiento, en mismas condiciones sobre las poblaciones bacterianas de *Enterococcus sp* donde alcanza un resultado de inactivación de 2.3 unidades logarítmicas.

5.4. Resultados del tratamiento de irradiación/ H_2O_2

La Tabla 8 muestra los recuentos bacterianos obtenidos durante los tratamientos de irradiación/ H_2O_2 . La Figura 9 representa el efecto desinfectante que la combinación de H_2O_2 e irradiación ejerce sobre la población de *E. Coli*.

Tabla 9. Recuento de *E. Coli* durante irradiación/H₂O₂.

Tiempo(minutos)	0	5	10	15	20	25	30
Recuento(N _t)	1,12E+07	8,80E+06	8,70E+06	7,56E+06	6,88E+06	4,61E+06	3,30E+06

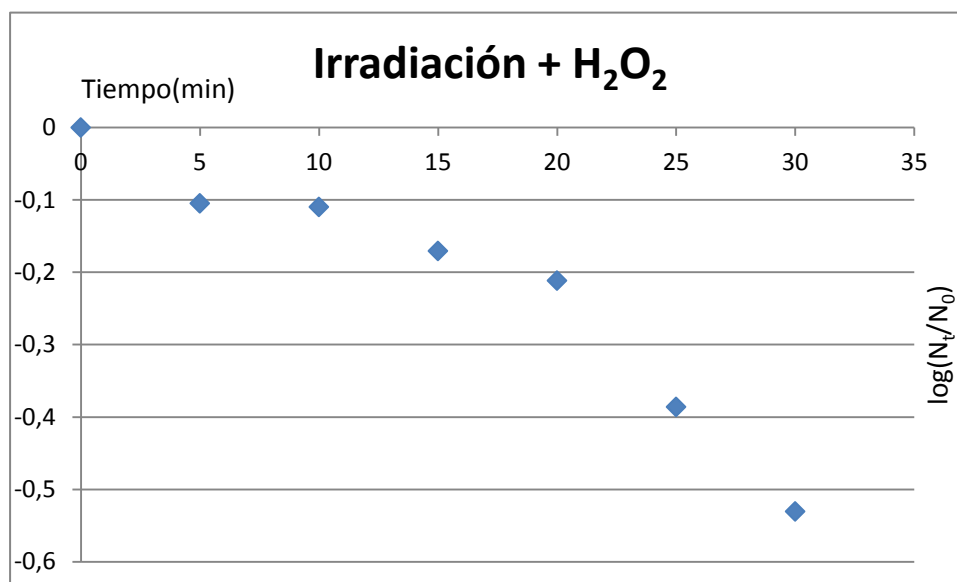


Figura 9. Inactivación de la bacteria *E. Coli* durante el tratamiento de irradiación/H₂O₂.

Se obtiene una reducción poblacional de 0.53 unidades logarítmicas al final del experimento.

En este tratamiento, el efecto conjunto de la acción desinfectante del peróxido de hidrógeno y la acción directa de la luz sobre las bacterias no mejora el proceso de radiación sobre las moléculas de H₂O₂, ya que en este caso se obtienen rendimientos de eliminación cercanos a 1 log.

Con este tratamiento, Lanao (2012) obtiene resultados de inactivación de *C. perfringens* en la misma matriz acuosa y aplicando el mismo tratamiento de 8.4 unidades logarítmicas en su forma vegetativa y de 1.1 unidades logarítmicas en su forma de esporos, esto nos muestra que la forma esporulada es más resistente. También aplica el mismo tratamiento, en mismas condiciones sobre las poblaciones bacterianas de *Enterococcus*

sp donde alcanza un resultado de inactivación de 0.4 unidades logarítmicas.

5.5.Resultados del tratamiento de fotocátalisis/H₂O₂

La Tabla 9 muestra los recuentos bacterianos obtenidos durante los tratamientos de fotocátalisis/H₂O₂. La Figura 10 representa el efecto desinfectante que la combinación de fotocátalisis y H₂O₂ ejerce sobre la población de *E. Coli*.

Tabla 9. Recuento de *E. Coli* durante fotocátalisis/H₂O₂

Tiempo(minutos)	0	5	10	15	20	25	30
Recuento(Nt)	2,99E+07	2,62E+07	2,39E+07	1,81E+07	1,72E+07	1,68E+07	1,50E+07

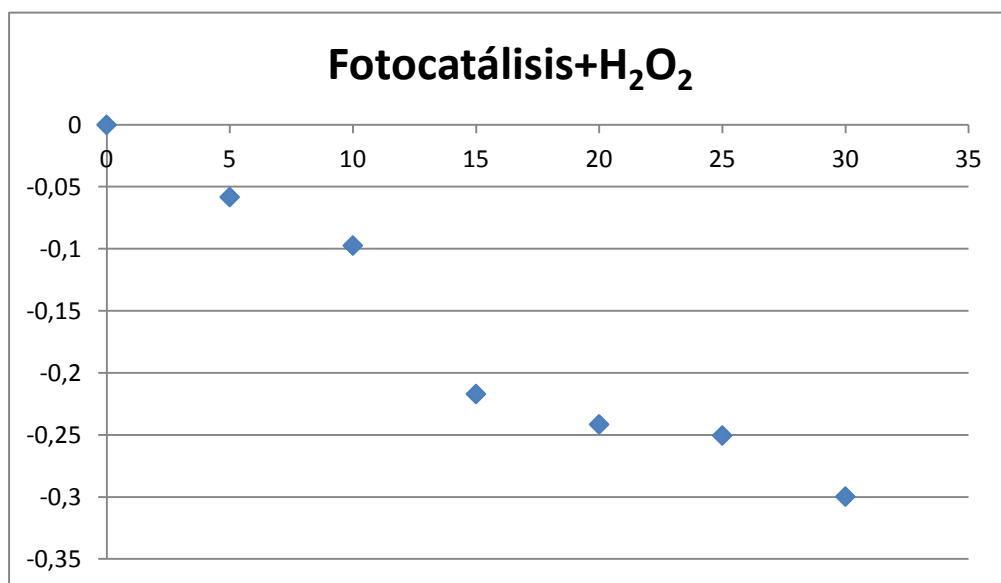


Figura 10. Inactivación de la bacteria *E. Coli* durante el tratamiento de fotocátalisis/H₂O₂.

Se obtiene una reducción poblacional de 0.3 unidades logarítmicas al final del experimento.

Con la aplicación de este tratamiento, Lanao (2012) obtiene resultados de inactivación de *C. perfringens* en la misma matriz acuosa y aplicando el

mismo tratamiento de 6.9 unidades logarítmicas en su forma vegetativa y de 1 unidades logarítmicas en su forma de esporos, esto nos muestra que la forma esporulada es más resistente. También aplica el mismo tratamiento, en mismas condiciones sobre las poblaciones bacterianas de *Enterococcus sp* donde alcanza un resultado de inactivación de 1.8 unidades logarítmicas.

Con este resultado, 0.3 unidades logarítmicas, se observa que es el proceso fotocátalisis/ H_2O_2 ligeramente inferior al obtenido con el tratamiento de irradiación/ H_2O_2 , 0.53 unidades logarítmicas, y este es inferior al obtenido con la irradiación en solitario, 0.8 unidades logarítmicas, y este muy inferior a la inactivación alcanzada mediante el tratamiento de fotocátalisis, 3.2 unidades logarítmicas.

De estos resultados se puede derivar que no se aprecia un fenómeno de sinergia entre el TiO_2 y el H_2O_2 , en presencia de irradiación, que permita obtener los máximos resultados de desinfección entre todos los tratamientos aplicados, como cabría esperar, pues participan conjuntamente tres agentes desinfectantes.

Este comportamiento puede deberse a que ante una concentración tan elevada de radicales activos, el H_2O_2 en lugar de favorecer la acción desinfectante del proceso, participe como secuestrador de radicales hidroxilo formando radicales hidroperóxidos o peroxo-compuestos en la superficie del TiO_2 , perjudicando la actividad del proceso fotocatalítico, tal y como describe *Kositzi (2004)*. Estos radicales hidroperóxidos son menos reactivos en cuanto a desinfección (*Legrini et al., 1993*). De aquí se deriva la importancia de que se establezca una dosis adecuada en la combinación de tratamientos para no obtener un efecto contrario al buscado.

A continuación se muestra una gráfica donde se puede observar la comparativa de la inactivación de la bacteria *E.Coli* según el tratamiento de radiación que se ha llevado a cabo, figura 11:

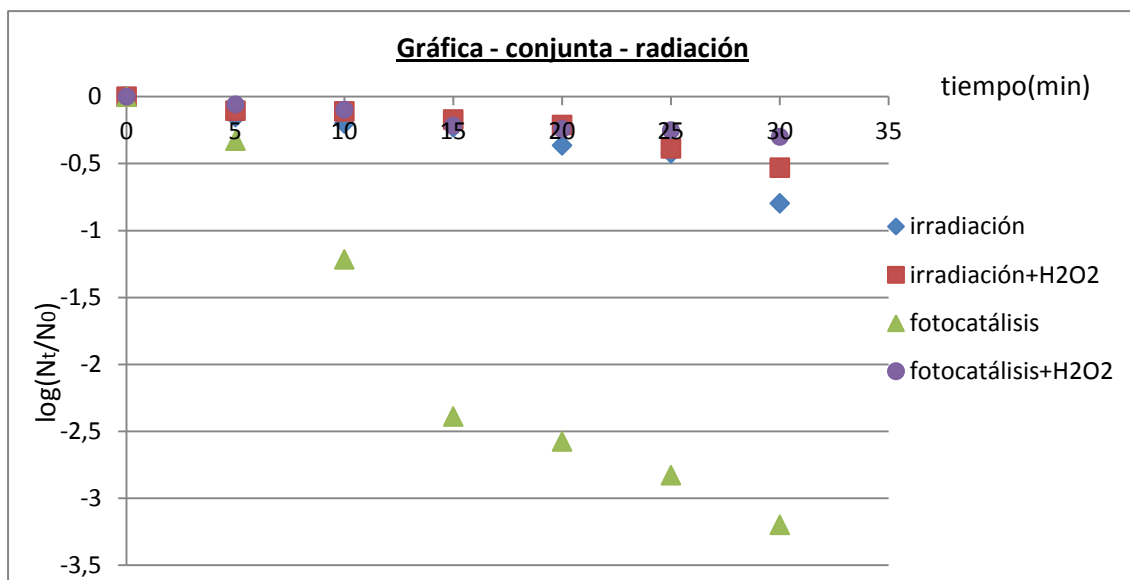


Figura 11. Representación conjunta de la inactivación de *E.Coli* mediante los tratamientos de irradiación.

5.6.Resultados del tratamiento de $O_3/H_2O_2/TiO_2$

En la Tabla 10 se muestran las poblaciones bacterianas supervivientes a lo largo del experimento conjunto.

Tabla 10. Recuento de *E. Coli* durante $O_3/H_2O_2/TiO_2$

Tiempo(minutos)	0	1	4	7	10
Recuento(N_t)	4,35E+08	1,09E+06	5,60E+04	7,18E+03	5,89E+03
mg O_3 /L consumido	0	4,14	19,44	34,74	50,04

La Figura 12 representa la curva de inactivación durante el tratamiento. Se observa una caída inicial brusca de la población, seguida de un periodo

de inactivación más lento que finaliza con una reducción bacteriana de 5.1 unidades logarítmicas.

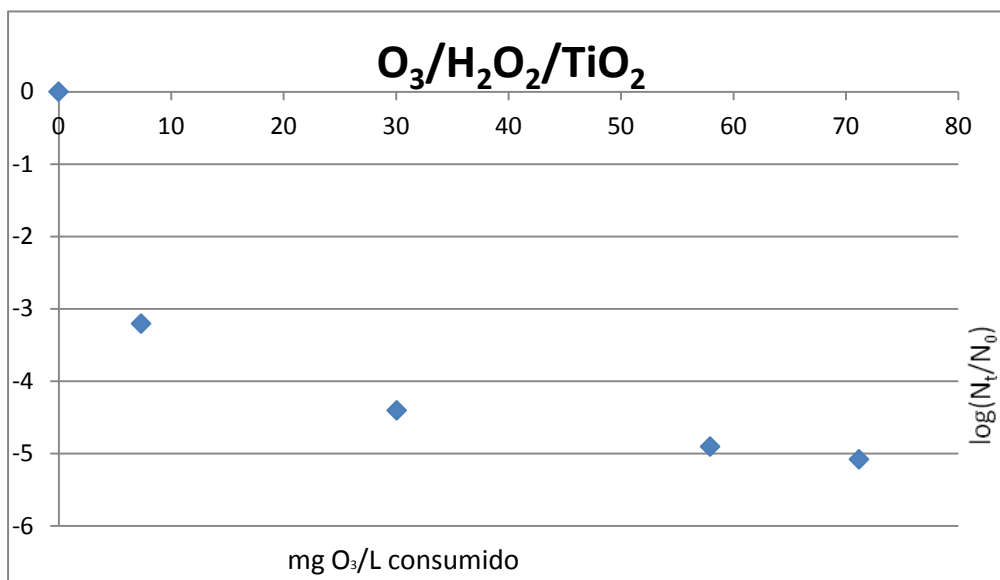


Figura 12. Inactivación de la bacteria E. Coli durante el tratamiento de O₃/H₂O₂/TiO₂.

En este tratamiento, Lanao (2012) obtiene resultados de inactivación sobre *Enterococcus sp* en la misma matriz acuosa y aplicando el mismo tratamiento de 2.2 unidades logarítmicas.

5.7.Resultados de ECM, R² y Gráficas de la modelización cinética

Las Tablas 11, 12, 13, 14 y 15 recogen los valores de los parámetros cinéticos obtenidos tras aplicar los modelos matemáticos seleccionados, el ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos para la bacteria de estudio, mediante el coeficiente de determinación (R²) y el error cuadrático medio (ECM).

ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE LA *ESCHERICHIA COLI* EN AGUAS MEDIANTE PROCESOS DE FOTOCATÁLISIS.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de la bacteria de estudio en el tratamiento de irradiación (λ : 320-800 nm).

<u>Bacteria <i>E. Coli</i></u>	Modelo de Hom				ECM	R ²
	k_{ap} (min ⁻¹ · W m ⁻²)	m				
	0.004	1.49			0.07	0.91
Modelo bifásico						
	P	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)		ECM	R ²
	0.99	0.05	0.05		0.08	0.87
Modelo de Mafart						
	p	δ (min)			ECM	R ²
	2.46	35.60			0.06	0.93

Tabla 12. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de la bacteria de estudio en el tratamiento de fotocátalisis (λ : 320-800 nm).

<u>Bacteria <i>E. Coli</i></u>	Modelo de Hom				ECM	R ²
	k_{ap} (min ⁻¹ · W m ⁻²)	m				
	0.19	0.837			0.27	0.95
Modelo bifásico						
	P	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)		ECM	R ²
	0.997	0.37	0.06		0.08	0.87
Modelo de Mafart						
	p	δ (min)			ECM	R ²
	0.79	6.11			0.27	0.95

Tabla 13. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de la bacteria de estudio en el tratamiento de irradiación /H₂O₂ (λ : 320-800 nm).

<u>Bacteria <i>E. Coli</i></u>	Modelo de Hom				ECM	R ²
	k_{ap} (min ⁻¹ · W m ⁻²)	m				
	0.001	1.66			0.03	0.96
Modelo bifásico						
	P	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)		ECM	R ²
	0.996	0.04	0.04		0.051	0.91
Modelo de Mafart						
	p	δ (min)			ECM	R ²
	2.11	42.49			0.03	0.97

Tabla 14. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de la bacteria de estudio en el tratamiento de fotocátalisis/H₂O₂ (λ : 320-800 nm).

<u>Bacteria <i>E. Coli</i></u>	Modelo de Hom					
	$k_{ap} \text{ (min}^{-1} \cdot W \text{ m}^{-2})$	m			ECM	R ²
	0.019	0.807			0.02	0.95
Modelo bifásico						
	P	$k_1 \text{ (min}^{-1})$	$k_2 \text{ (min}^{-1})$		ECM	R ²
	1	0.02	0.02		0.025	0.94
Modelo de Mafart						
	p	$\delta \text{ (min)}$			ECM	R ²
	0.78	132.34			0.02	0.96

Tabla 15. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de la bacteria de estudio en el tratamiento de O₃/H₂O₂/TiO₂.

<u>Bacteria <i>E. Coli</i></u>	Modelo de Hom					
	$k_{ap} \text{ (min}^{-1} \cdot W \text{ m}^{-2}\text{)}$	m			ECM	R ²
	3.26	0.20			0.07	0.99
	Modelo bifásico					
	P	$k_1 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$k_2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$		ECM	R ²
	0.99	5.93	0.23		0.29	0.97
	Modelo de Mafart					
	p	$\delta \text{ (min)}$			ECM	R ²
	0.20	0.00			0.08	0.99

Los valores de los índices de ajuste, ECM y R², en los tratamientos aplicados son bastante buenos, pues tienen valores cercanos a 1 en el caso del coeficiente de correlación (R²) y valores cercanos a 0 en el caso del error cuadrático medio (ECM), a excepción de los índices de los modelos Hom, Bifásico y Mafart en el tratamiento de irradiación, el modelo Bifásico en fotocátalisis e irradiación/H₂O₂, donde el valor R² está muy alejado del valor óptimo, por debajo de un 0,95.

Comparando los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para los distintos tratamientos aplicados se observa que los valores de las constantes de velocidad de inactivación (k_{ap} en el modelo de Hom y la k_1 y K_2 en el modelo bifásico) son muy superior en el tratamiento de $O_3/H_2O_2/TiO_2$ que en el resto, y mucho menor que este pero mayor que el resto estaría el tratamiento de fotocátalisis. El parámetro δ del modelo de Mafart, que indica el tiempo necesario para conseguir 1 unidad logarítmica de inactivación, es muy inferior en el tratamiento de fotocátalisis que en los demás tratamientos, excluyendo al tratamiento de $O_3/H_2O_2/TiO_2$ donde su valor es cero.

En la siguiente tabla, (Tabla16), se muestra una comparativa de los mismos parámetros cinéticos sobre las curvas de inactivación durante los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/ H_2O_2 , fotocátalisis/ H_2O_2 y $O_3/H_2O_2/TiO_2$.

Tabla 16. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de la bacteria *E. Coli* en los tratamientos de irradiación, Irradiación/H₂O₂, Fotocatálisis, Fotocatálisis/H₂O₂ y O₃/H₂O₂/TiO₂.

Modelo de Hom					
	$k_{ap} \text{ (min}^{-1} \cdot \text{W m}^{-2}\text{)}$	m		ECM	R ²
Irradiación	0.004	1.49		0.07	0.91
Irradiación/H ₂ O ₂	0.001	1.66		0.03	0.96
Fotocatálisis	0.19	0.837		0.27	0.95
Fotocatálisis/H ₂ O ₂	0.019	0.807		0.02	0.95
O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂	3.26	0.20		0.07	0.99
Modelo bifásico					
	P	$k_1 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$k_2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	ECM	R ²
Irradiación	0.99	0.05	0.05	0.08	0.87
Irradiación/H ₂ O ₂	0.996	0.04	0.04	0.05	0.91
Fotocatálisis	0.997	0.37	0.06	0.08	0.87
Fotocatálisis/H ₂ O ₂	1	0.02	0.02	0.025	0.94
O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂	0.99	5.93	0.23	0.29	0.97
Modelo de Mafart					
	p	$\delta \text{ (min)}$		ECM	R ²
Irradiación	2.46	35.60		0.06	0.93
Irradiación/H ₂ O ₂	2.11	42.49		0.03	0.97
Fotocatálisis	0.79	6.11		0.27	0.95
Fotocatálisis/H ₂ O ₂	0.78	132.34		0.02	0.96
O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂	0.20	0.00		0.08	0.99

Como observamos en la Tabla 16, en ningún tratamiento de radiación llegamos a unos valores de R^2 cercanos al 0.99. Por ello, se han aplicado otros modelos cinéticos adicionales, presentes en el programa informático GlnaFit.xls y Solver, para intentar buscar un ajuste mejor de los datos a un modelo cinético, y estos son algunos de los datos obtenidos (Tabla 17).

Tabla 17. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos adicionales aplicados sobre la inactivación de la bacteria *E. Coli* en los tratamientos de irradiación, Irradiación/H₂O₂, Fotocatálisis, Fotocatálisis/H₂O₂ y O₃/H₂O₂/TiO₂

<i>Bacteria E. Coli</i>	Modelo de Coroller				
	P	Delta₁	Delta₂	ECM	R²
Irradiación	4.73	1.47	33.84	0.05	0.96
Fotocatálisis	2.32	9.10	30.64	0.03	0.999
	Modelo Geeraerd				
	SI	K_{máx.}		ECM	R²
Irradiación/H ₂ O ₂	23.22	0.11		0.02	0.97
Fotocatálisis/H ₂ O ₂	9.68	0.20		0.01	0.97

Se puede observar que los valores de coeficiente de correlación (R²) con estos modelos cinéticos son más cercanos a 1 que en los modelos cinéticos anteriores, y los errores cuadráticos medios (ECM), se acercan más al valor 0 que en los modelos anteriormente mencionados.

En la siguiente tabla 18, se muestran los parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados por Lanao (2012) sobre la bacteria *Enterococcus sp.*:

Tabla 18. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *Enterococcus sp.* en los tratamientos de irradiación, Irradiación/H₂O₂, Fotocatálisis, Fotocatálisis/H₂O₂ y O₃/H₂O₂/TiO₂

Modelo de Hom					
	k_{ap} (min ⁻¹ · W m ⁻²)	m	ECM	R ²	
Irradiación	0,003	1,28	0,019	0,94	
Irradiación/H ₂ O ₂	0,0002	2,17	0,04	0,90	
Fotocatálisis	0,049	1,13	0,08	0,98	
Fotocatálisis/H ₂ O ₂	0,087	0,90	0,14	0,95	
O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂	3,180	0,19	0,16	0,97	
Modelo bifásico					
	P	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	R ²
Irradiación	---	---	---	---	---
Irradiación/H ₂ O ₂	---	---	---	---	---
Fotocatálisis	---	---	---	---	---
Fotocatálisis/H ₂ O ₂	---	---	---	---	---
O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂	0,99991	5,93	0,18	0,16	0,99
Modelo de Mafart					
	p	δ (min)	ECM	R ²	
Irradiación	1,36	83,65	0,02	0,94	
Irradiación/H ₂ O ₂	2,28	46,38	0,05	0,90	
Fotocatálisis	1,10	13,47	0,11	0,98	
Fotocatálisis/H ₂ O ₂	0,86	13,77	0,19	0,95	
O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂	0,19	0,002	0,26	0,97	

Como se puede observar en comparación con la tabla 18, se aprecian algunas diferencias significativas, utilizando los mismos tratamientos y en las mismas condiciones entre la bacteria *Enterococcus sp.* (Lanao 2012) y la bacteria *E. Coli* tratada en este proyecto.

En primer lugar, en el modelo de Hom se observa que las K_{ap} de los tratamientos de irradiación son muy parecidas, en cambio en los tratamientos de irradiación/H₂O₂ y fotocátalisis las K_{ap} en la bacteria *E.Coli* son mayores, es decir se obtiene una mayor efectividad. En cambio en el

tratamiento de fotocátalisis/ H_2O_2 la bacteria *Enterococcus sp.* presenta una K_{ap} mayor. Se comprueba que la mayor efectividad para ambas bacterias se encuentra en el tratamiento de $O_3/H_2O_2/TiO_2$, donde las K_{ap} toman valores entorno a $3,2 \text{ (min}^{-1} * w * m^{-2})$.

En segundo lugar, en el modelo bifásico a la bacteria *Enterococcus sp.* no se le aplica ningún tratamiento de radiación, y en el tratamiento de $O_3/H_2O_2/TiO_2$ se obtiene una K_1 idéntica para ambas bacterias, y una K_2 ligeramente menor para la bacteria *Enterococcus sp.*

Por último, en el modelo de Mafart el valor del parámetro δ en el tratamiento de irradiación y fotocátalisis para *Enterococcus sp.* es más del doble que para la bacteria *E.Coli*, en los tratamiento de irradiación/ H_2O_2 y $O_3/H_2O_2/TiO_2$ son valores similares, cabe destacar que el valor de δ en el tratamiento $O_3/H_2O_2/TiO_2$ es entorno a cero, y por último en el tratamiento de fotocátalisis/ H_2O_2 para la bacteria *E.Coli* el valor de δ es muy superior al cualquier otro valor obtenido, alrededor de 132 minutos.

Las Figuras 13, 14, 15 y 16 reflejan el ajuste de los modelos aplicados sobre las curvas de inactivación, con los cuatro tratamientos de irradiación estudiados. Además de la figura 16, donde se observa con el tratamiento de $O_3/H_2O_2/TiO_2$.

Irradiación

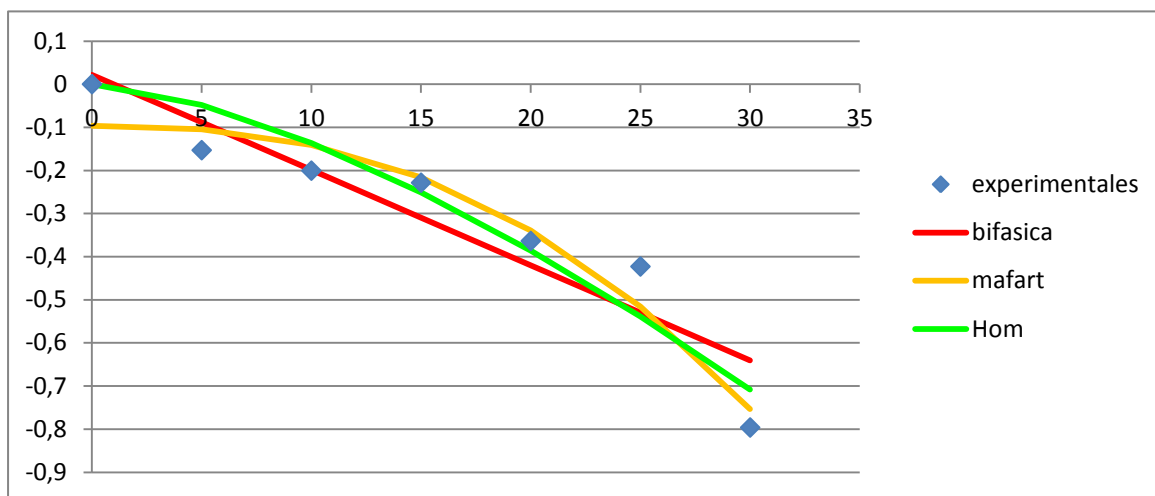


Figura 13. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de E. Coli mediante el tratamiento de irradiación.

Se observa que el modelo de Mafart es el que más se le ajustan los datos con un valor de R^2 de 0.93, seguido del modelo de Hom con un valor de 0.91, y por último el modelo bifásico con un valor de 0.87. Estos valores nos informan del mal ajuste de los datos a los modelos aplicados ya que ninguno alcanza un valor de 0.95.

Irradiación/ H_2O_2

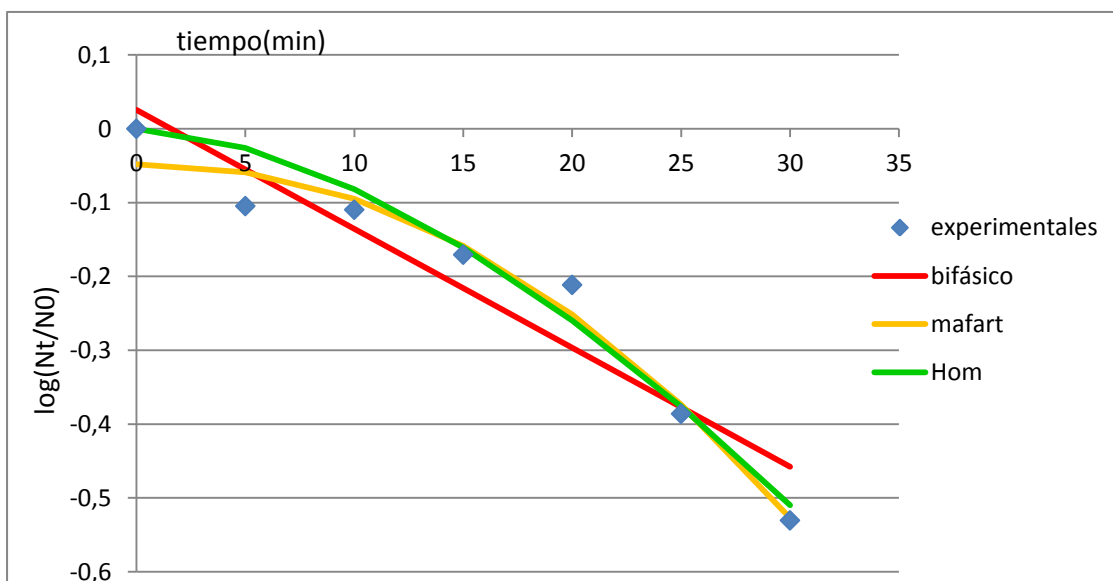


Figura 14. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de E. Coli mediante el tratamiento de irradiación/ H_2O_2 .

Se puede observar que el mejor ajuste de datos es sobre el modelo de Mafart, con un valor de R^2 de 0.97 , seguido del modelo de Hom con un valor de 0.96 y por último el que presenta un peor ajuste de los datos al modelo es, el modelo bifásico, con un valor de R^2 de 0.91 . En este último modelo es el único de este tratamiento que está por debajo del umbral mínimo de R^2 aconsejable de 0.95 .

Fotocatálisis/H₂O₂

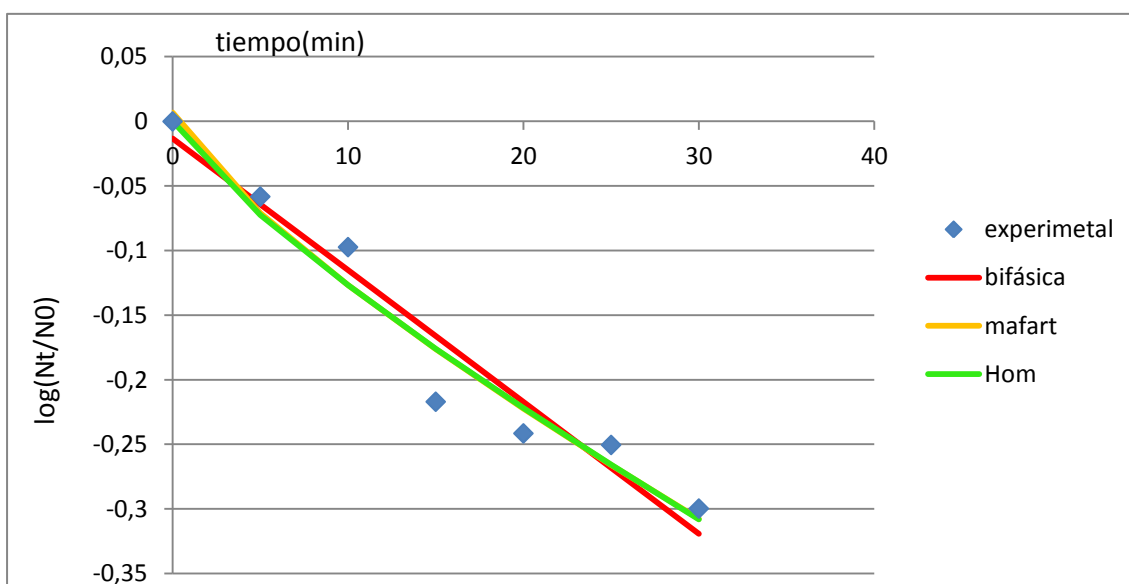


Figura 15. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de E. Coli mediante el tratamiento de fotocatálisis/H₂O₂.

En este tratamiento podemos ver que los datos que presentan un mejor ajuste son sobre el modelo de Mafart con un valor de R^2 de 0.96, seguido por el modelo de Hom con un valor de 0.95, y por último con un valor de R^2 de 0.94, el modelo bifásico, el cual sería el único que no alcanzaría el valor mínimo aconsejable de 0.95 .

Fotocatálisis

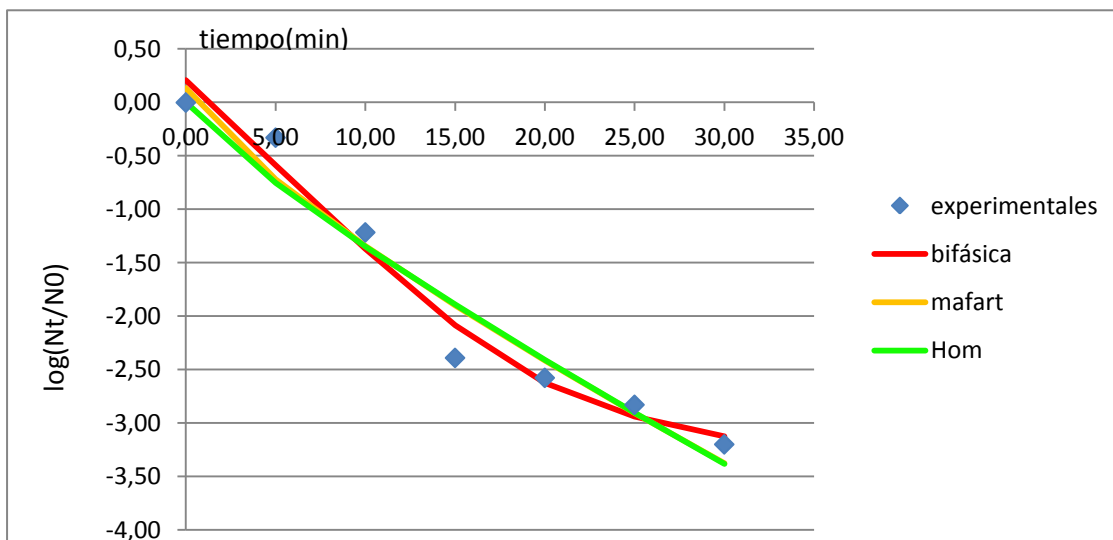


Figura 16. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de E. Coli mediante el tratamiento de fotocatálisis.

Se obtienen valores de R^2 bajos en general, en el modelo de Mafart y Hom se dan valores de 0.95 , y en el modelo bifásico se consigue un valor de 0.87 .

O₃/H₂O₂/TiO₃

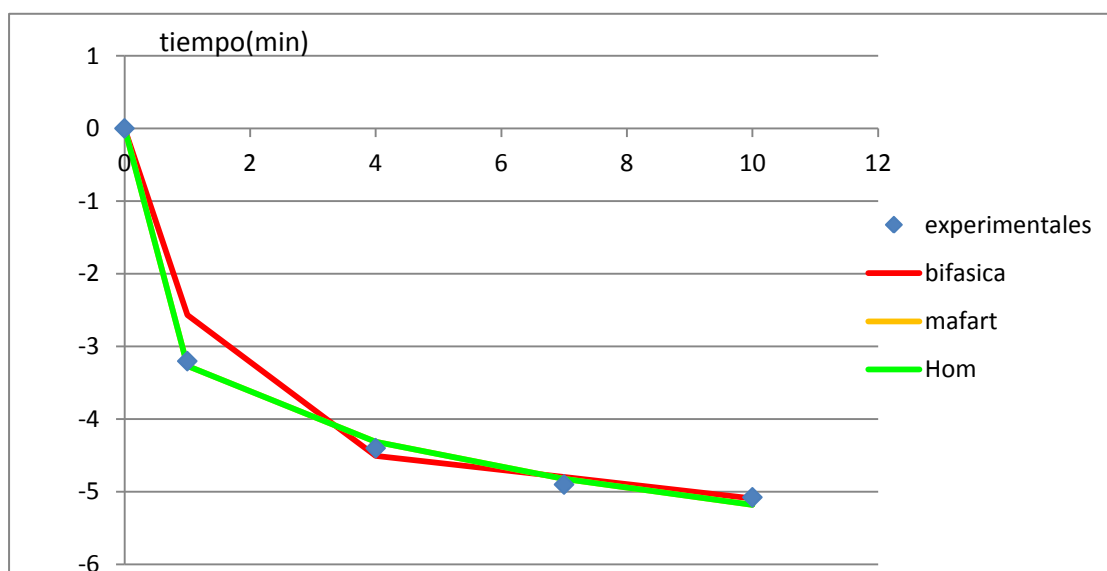


Figura 17. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de E. Coli mediante el tratamiento de O₃/H₂O₂/TiO₃.

En este tratamiento con ozono se consiguen valores muy buenos, los cuales se ajustan muy bien a los modelos de Mafart y Hom con valores de R^2 de 0.99 , y en el modelo de bifásico obtenemos un ajuste de datos también bueno con un valor de 0.97 .

En general se comprueba que el mejor ajuste de datos se da sobre el modelo de Mafart.

Finalmente, las Figuras 18, 19, 20, 21 y 22, muestran el ajuste de los datos sobre los modelos matemáticos aplicados, sobre las curvas de inactivación obtenidas, enfrentando los valores logarítmicos de inactivación observados frente a los valores logarítmicos de inactivación estimados. Cuanto más cerca esté la distribución de la nube de puntos a la recta, mejor se ajustan los datos experimentales sobre el aplicado.

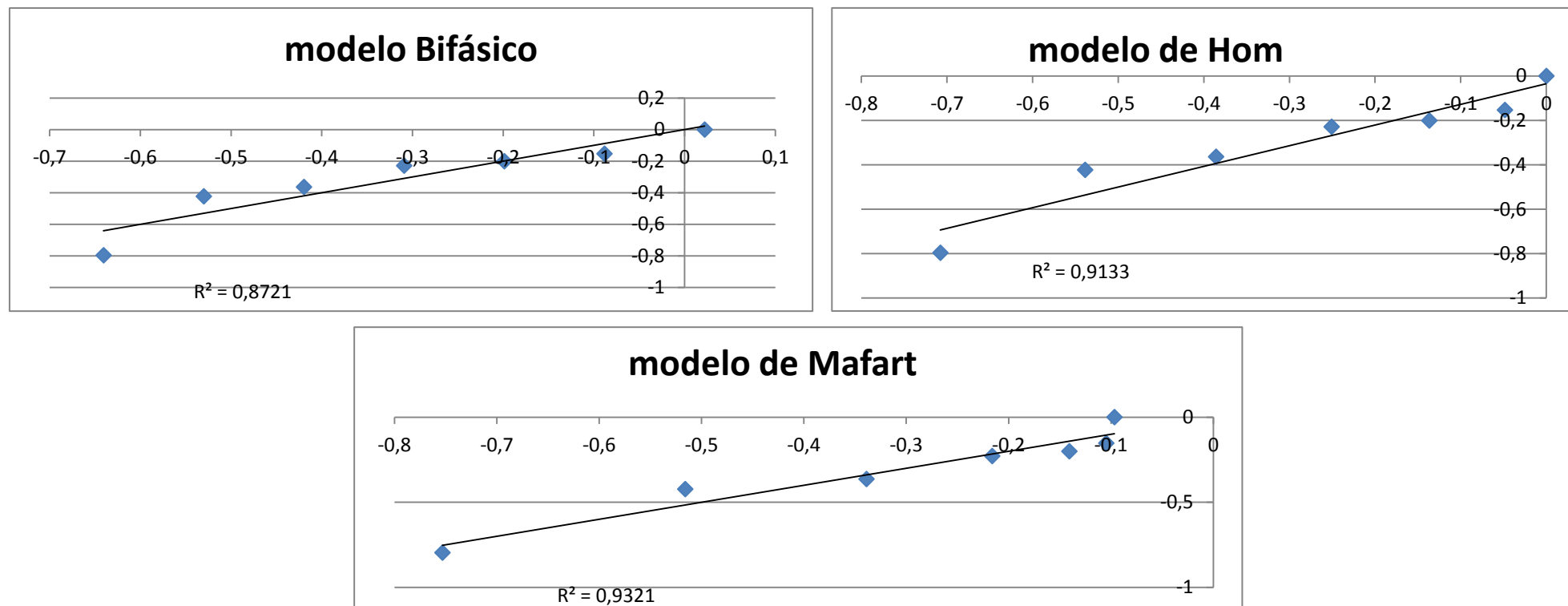


Figura 18. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las bacterias *E. Coli* mediante tratamiento de irradiación.

En la figura 18 se representan los valores logarítmicos de inactivación observados frente a los valores logarítmicos de inactivación estimados en los modelos cinéticos aplicados sobre la bacteria *E.Coli* en el tratamiento de irradiación.

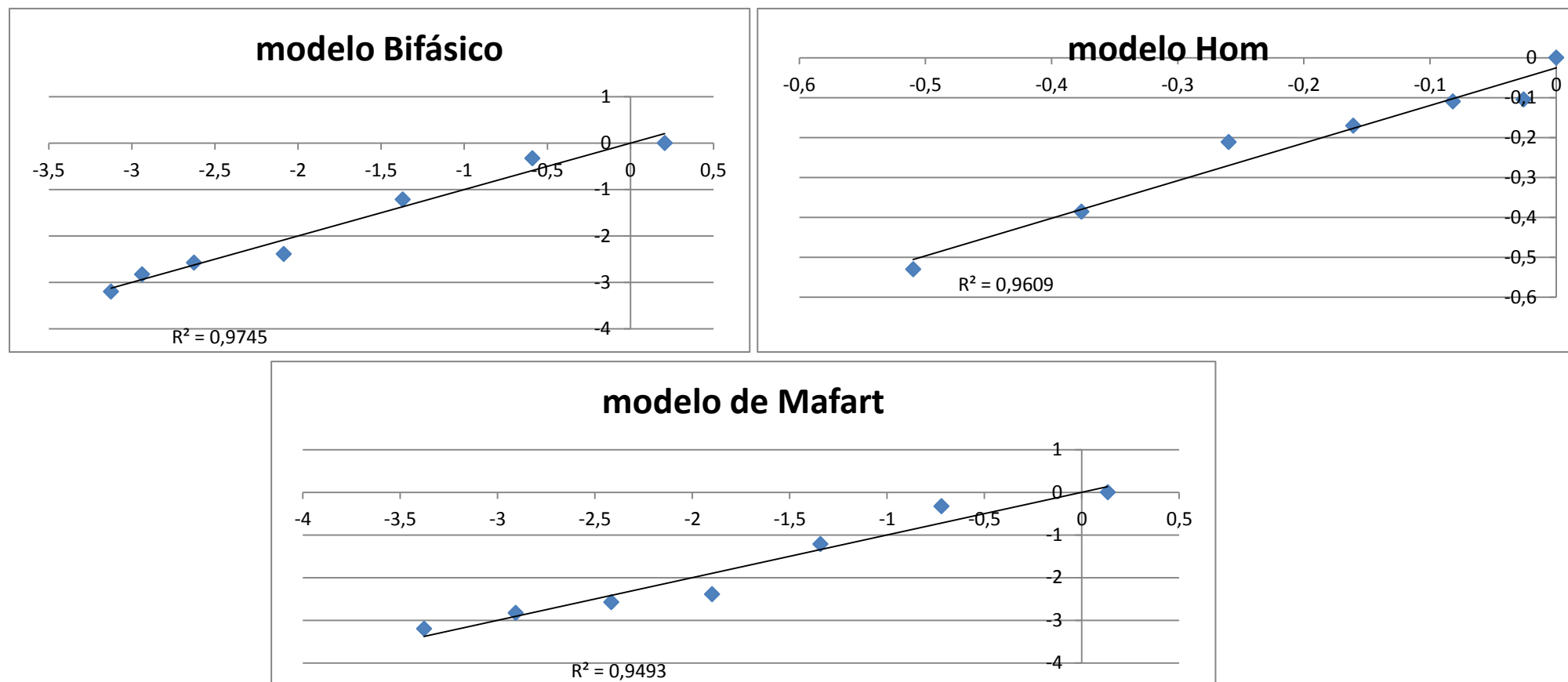


Figura 19. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las bacterias *E. Coli* mediante tratamiento de fotocatálisis.

En la figura 19 se representan los valores logarítmicos de inactivación observados frente a los valores logarítmicos de inactivación estimados en los modelos cinéticos aplicados sobre la bacteria *E.Coli* en el tratamiento de fotocatálisis.

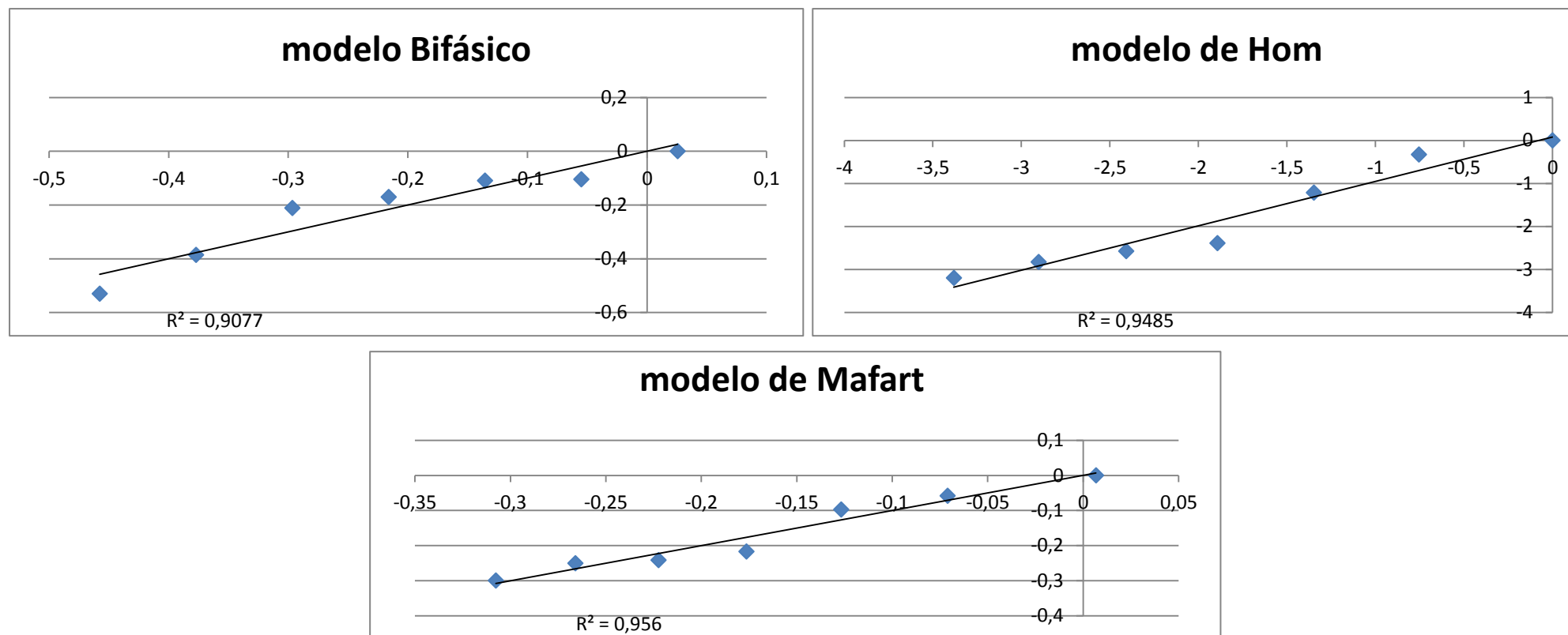


Figura 20. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las bacterias *E. Coli* mediante tratamiento de irradiación/ H_2O_2 .

En la figura 20 se representan los valores logarítmicos de inactivación observados frente a los valores logarítmicos de inactivación estimados en los modelos cinéticos aplicados sobre la bacteria *E.Coli* en el tratamiento de irradiación/ H_2O_2 .

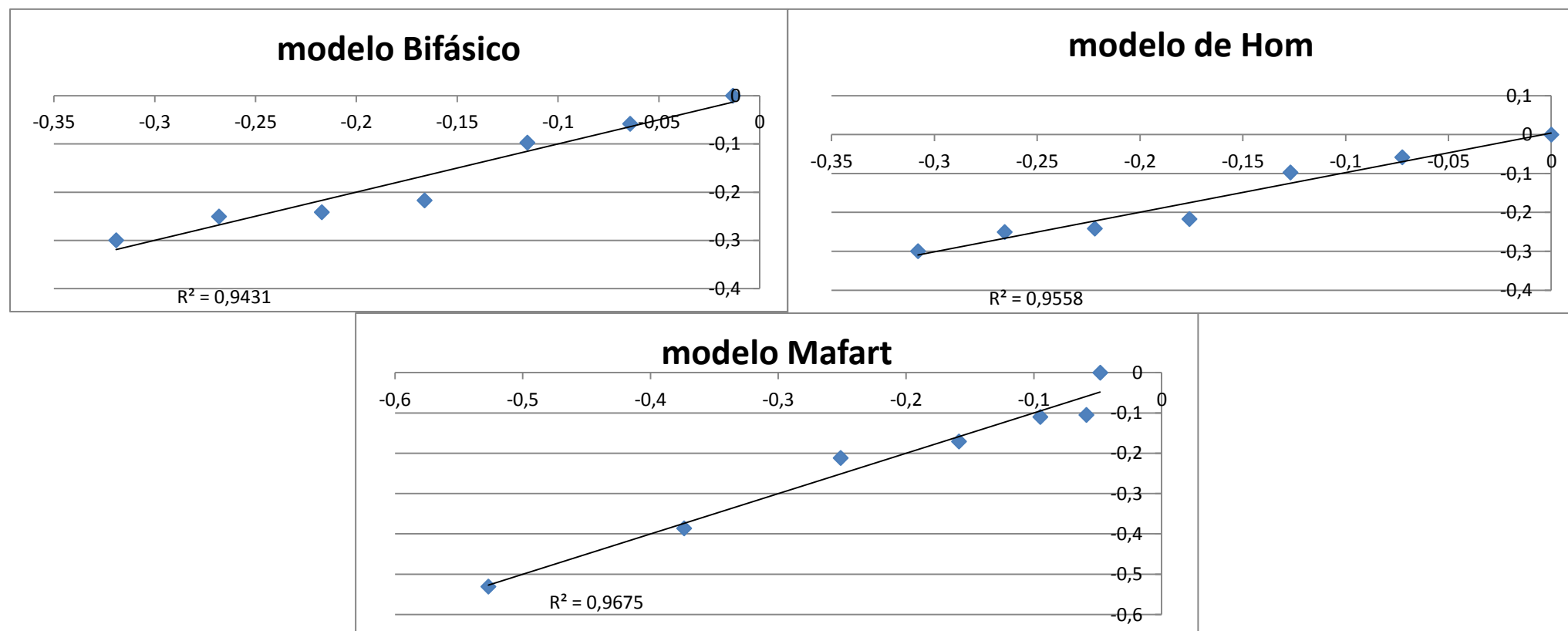


Figura 21. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las bacterias *E. Coli* mediante tratamiento de fotocatalísis/H₂O₂.

En la figura 21 se representan los valores logarítmicos de inactivación observados frente a los valores logarítmicos de inactivación estimados en los modelos cinéticos aplicados sobre la bacteria *E.Coli* en el tratamiento de fotocatalísis/H₂O₂.

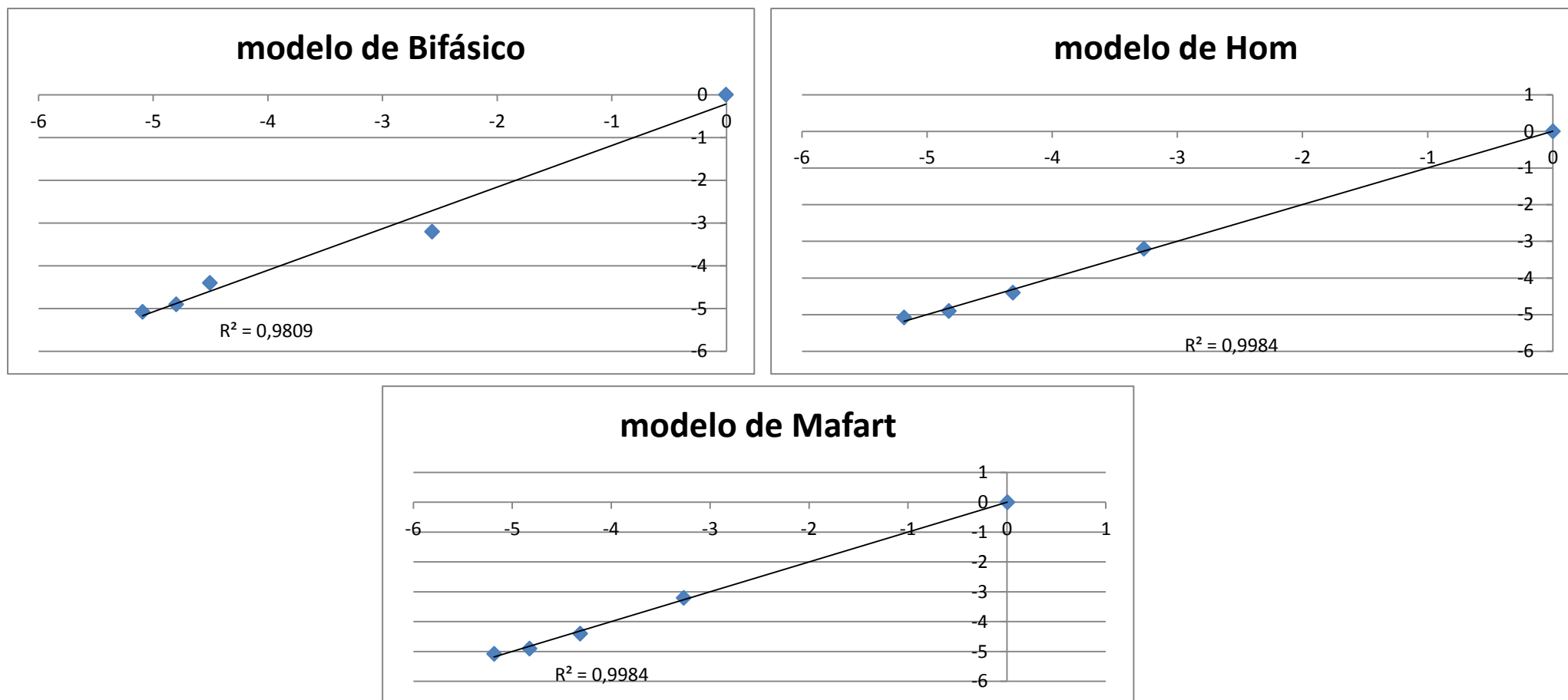


Figura 22. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las bacterias *E. Coli* mediante tratamiento de $O_3/H_2O_2/TiO_2$.

En la figura 22 se representan los valores logarítmicos de inactivación observados frente a los valores logarítmicos de inactivación estimados en los modelos cinéticos aplicados sobre la bacteria *E.Coli* en el tratamiento de $O_3/H_2O_2 /TiO_2$.

6. Conclusiones

Las conclusiones alcanzadas en este Proyecto Final de Carrera son las expuestas a continuación:

- En la aplicación de los tratamientos de desinfección de *E. Coli* en este proyecto se han obtenido tanto valores de desinfección bajos (0.3, 0.8), como valores de desinfección altos (3.3, 5.1), por lo que podemos demostrar que se puede eliminar de las aguas la bacteria *E.Coli* de manera eficaz usando POAs de manera alternativa a los procesos de cloración convencionales.

- En el agua utilizada las características físico-químicas afectan a la desinfección obtenida a través de parámetros como la turbidez o los sólidos en suspensión, materia orgánica presente.
 - Como por ejemplo, la presencia de materia orgánica natural en el agua reduce el poder bactericida del ozono ya que compite con las bacterias presentes en la muestra por las especies reactivas desinfectantes generadas durante el proceso, confirmando que la desinfección con ozono depende de la calidad del agua.

- Es necesaria la activación del dióxido de titanio mediante una fuente de radiación adecuada ($\lambda < 385$ nm) para que participe activamente en el fenómeno de desinfección.

- No se aprecia un fenómeno de sinergia entre el TiO_2 y el H_2O_2 en presencia de radiación solar en los ensayos.

- Las variables más influyentes en la inactivación de *E.Coli* son el tiempo de tratamiento y el TiO_2 en lo que a radiación solar se refiere, mientras que en el tratamiento que combina ozono con dióxido de titanio y con peróxido de hidrógeno mejora los resultados de inactivación obtenidos en relación a los tratamientos de irradiación.

- Los modelos matemáticos primarios de Hom, bifásico y Mafart describen adecuadamente las cinéticas de desinfección de los tratamientos estudiados.

- Comparando los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para los distintos tratamientos aplicados se observa que los valores de las constantes de velocidad de inactivación (k_{ap} en el modelo de Hom y la k_1 y K_2 en el modelo bifásico) son muy superior en el tratamiento de $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ que en el resto, y mucho menor que este pero mayor que el resto estaría el tratamiento de fotocátalisis. El parámetro δ del modelo de Mafart, que indica el tiempo necesario para conseguir 1 unidad logarítmica de inactivación, es muy inferior en el tratamiento de fotocátalisis que en los demás tratamientos, excluyendo al tratamiento de $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ donde su valor es cero.

- Todos los modelos representados para los tratamientos estudiados muestran una nube de puntos cercana a la recta, si bien cabe destacar el mejor ajuste del modelo de Mafart y Hom en el tratamiento de $O_3/H_2O_2/TiO_2$.
- El tratamiento más efectivo en términos de desinfección en las condiciones estudiadas corresponde el que combina ozono/peróxido/dióxido de titanio alcanzando valores de desinfección de 5.1 unidades logarítmicas, y sin contar con el tratamiento en el que interviene el ozono el tratamiento más efectivo recaería sobre el tratamiento de fotocatálisis donde se alcanzan valores de desinfección de 3.2 unidades logarítmicas.
- Si se comparan los resultados de inactivación de *Enterococcus sp.* con los obtenidos a partir de *C. perfringens*, en el estudio de Lanao (2012), se deriva que las células vegetativas de *C. perfringens* son las formas bacterianas más sensibles a los tratamientos de irradiación aplicados, pues alcanzan mayores niveles de inactivación en menor tiempo con respecto a *Enterococcus sp.*

Comparándose los resultados de inactivación de *E.Coli* con los resultados obtenidos por Lanao (2012) sobre *C. perfringens* y *Enterococcus sp.*, se observa que las células vegetativas *C. perfringens* son una forma bacteriana más sensible a los tratamientos de irradiación aplicados que la bacteria *E.Coli*, (objeto de estudio en este PFC), y esta bacteria a la vez, es más sensible que la bacteria *Enterococcus sp.*

7. Bibliografía

- Blake D.M., Maness P.C., Huang Z., Wolfrum E.J., Huang J. 1999. Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and killing of cancer cells. *Separation and Purification Methods*, 28(1), 1-50.
- Blanco J., Malato S., Fernández-Ibañez P., Alarcón D., Gernjak W., Maldonado M.I. 2009. Review of feasible solar energy applications to water processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1437–1445.
- Boyle M., Sichel C., Fernández-Ibañez P., Arias-Quiroz B., Iriarte-Puña M., Mercado A., Ubomba-Jaswa E., McGuigan K.G. 2008. Bactericidal effect of solar water disinfection under real sunlight conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (10), 2997-3001.
- Bueno J. L., Sastre, H., Lawing, A. G., “Contaminación e Ingeniería Ambiental. Contaminación de las Aguas”. Ed. F.I.C.Y.T. 1997.
- C.P. Huang, Ch. Dong y Z. Tang, *Waste Management*, 13, 361-377 (1993).
- Chong M.N., Jin B., Chow C.W.K., Saint C. 2010. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Res.* 44, 2997-3027.
- Cho M., Chung H., Yoon J. 2003. Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone- initiated radical reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), 2284-2291.
- Directiva 98/83/CE de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- Directiva 2006/113/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de diciembre de 2006 relativa a la calidad exigida a las aguas para cría de moluscos.

- Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de febrero de 2006 relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño y por la que se deroga la Directiva 76/160/CEE.
- Directiva 2006/44/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de septiembre de 2006 relativa a la calidad de las aguas continentales que requieren protección o mejora para ser aptas para la vida de los peces.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- Elmolla E.S. y Chaudhuri M. 2009. Degradation of the antibiotics amoxicillin, ampicillin and cloxacillin in aqueous solution by the photo-Fenton process. *Journal of Hazardous Materials*, 172, 1476–1481.
- Elmolla E.S. y Chaudhuri M. 2010. Comparison of different advanced oxidation processes for treatment of antibiotic aqueous solution. *Desalination*, 256, 43–47.
- EPA, Environmental Protection Agency. 1999. Alternative Disinfectants and Oxidants. Guidance Manual. Office of Water. 815-R-99-014.
- Glaze, W.H. 1987. "Drinking water treatment with ozone". *Environmental Science and Technology*, 21, 224-230.
- Gomes A.I., Santos J.C., Vilar V.J.P., Boaventura R.A.R. 2009. Inactivation of bacteria *E.coli* and photodegradation of humic acids using natural sunlight. *Applied Catalysis B: Environmental*, 88, 283-291.
- Gómez N. Modelización de la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

- Haas C.N. y Joffe J. 1994. Disinfection under dynamic conditions: modification of Hom's model for decay. *Environmental Science and Technology*, 28, 1367-1369.
- Huang Z., Maness P.C., Blake D.M., Wolfrum E.J., Smolinski S.L., Jacoby W.A. 2000. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 130, 163-170.
- Ibarz, C. 2008. "Desactivación de Enterococos en agua natural mediante fotocátalisis con TiO₂ y radiación solar". Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Ireland J.C., Klostermann P., Rice E.W., Clark R.M. 1993. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (5), 1668-1670.
- J.R. Bolton y S.R. Cater, "Aquatic and Surface Photochemistry", 467-490. G.R. Helz, R.G. Zepp y D.G. Crosby Editores. Lewis, Boca Raton, FL, EEUU (1994).
- Kositzi M., Poullos I., Malato S., Caceres J., Campos A. 2004. Solar photocatalytic treatment of synthetic municipal wastewater. *Water Research*, 38, 1147-1154.
- Lanao M., Ormad M.P., Goñi P., Miguel N., Mosteo R., Ovelleiro J.L. 2010. Inactivation of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells by photolysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂. *Solar Energy* 84, 703-709.
- Lanao M., Ormad M.P., Mosteo R., Ovelleiro J.L.. 2012. Inactivation of *Enterococcus* sp. by photolysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂ in natural water. *Solar Energy*, 86, 619-625.
- Lee Y. y Nam S. 2002. Reflection on kinetic models to the chlorine disinfection for drinking water production. *The Journal of Microbiology*, 40 (2), 119-124.

- Legrini O., Oliveros E., Braun A.M. 1993. Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews*, 93, 671–698.
- Ley 14/1986 General de Sanidad de 25 de abril. BOE 102.
- Li L. 2004. Effects of initial microbial density on disinfection efficiency in a continuous flow system and validation of disinfection batch kinetics in a continuous flow system. Tesis Doctoral. Universidad de Drexel.
- Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos*. Ed. Pearson Educación S.A, 10ª Ed. ISBN: 84-205-3679-2.
- Malato S., Fernández-Ibáñez P., Maldonado M.I., Blanco J., Gernjak W. 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147, 1-59.
- Mamane H., Shemer H., Linden K.G. 2007. Inactivation of *E.coli*, *B. subtilis* spores and MS2, T4 and T7 phage using UV/H₂O₂ advanced oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 479-486.
- Maness P., Smolinski S., Blake D.M., Zheng H., Wolfrum E., Jacoby W.A. 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4094-4098.
- McGuigan K.G., Joyce T.M., Conroy R.M., Gillespie J.B., Elmore-Meegan M. 1998. Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles: characterizing the bacterial inactivation process. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1138-1148.
- Medema G.J., Bahar M., Schets F.M. 1997. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, Faecal Enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms. *Water Science and Technology*, 35 (11-12), 249-252.
- Méndez J. M., Gonzalez C., Alvarado-Lassman A., Alvarado-Kinnell G., Martinez-Delgadillo S. 2008. Fecal bacteria survival in ammonia-treated

wastewater dewatered sludges. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 7 (3), 229-235.

- Norma UNE-EN ISO 7027: 1999 “Calidad del agua. Determinación de la turbiedad”.
- Norma UNE-EN ISO 9308-1:2001: “Calidad del agua. Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración en membrana. (ISO 9308-1:2000)”.
- Norma UNE-EN ISO 27888: “Calidad del agua. Determinación de la conductividad eléctrica. (ISO 7888:1985). (Versión oficial EN 27888:1993)”.
- O. Legrini, E. Oliveros y A.M. Braun, Chem. Rev., 93, 671-698 (1993).
- Orden de 11 Mayo de 1988 sobre características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de aguas superficiales cuando sean destinadas a la producción de agua potable. BOE 124 de 24 de mayo de 1988.
- Ormad M.P., Miguel N., Lanao M., Mosteo R., Ovelleiro J.L. 2010. Effect of application of ozone and ozone combined with hydrogen peroxide and titanium dioxide in the pesticides removal from water. Ozone Science and Engineering, 32, 25-32.
- Pernitsky D.J., Finch G.R., Huck P.M. 1995. Disinfection kinetics of heterotrophic plate-count bacteria in biologically treated potable water. Water Research, 29 (5), 1235-1241.
- RD 140/2003 de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE 54 de 21 de febrero de 2003.
- RD 1620/2007 de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. BOE 294 de 8 de diciembre de 2007.
- Rincón A.G., Pulgarin C., Adler N., Peringer P. 2001. Interaction between *E. coli* inactivation and DBP-precursors-dihydroxybenzene isomers- in the

photocatalytic process of drinking water disinfection with TiO₂. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 139, 233-241.

- Rincón A.G. y Pulgarin C. 2003. Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous–intermittent) light intensity and of (suspended–fixed) TiO₂ concentration. Applied Catalysis B: Environmental, 44, 263-284.
- Rincón A.G. y Pulgarin C. 2007. Solar photolytic and photocatalytic disinfection of water at laboratory and field scale. Effect of the chemical composition of water and study of the postirradiation events. Journal of Solar Energy Engineering, 129, 100-110.
- Tortor, G.J.; Funke, B.R.; Case C.L. 1993. “Introducción a la microbiología”. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. 2004. Guidelines for Water Reuse. EPA/625/R-04/108.
- W.H. Glaze, J.W. Kang y D.H. Chapin, Ozone Sci. & Technol., 9, 335-352 (1987).
- “Water Treatment Handbook, Degrémont”, 6 a Edición. Editorial Lavoisier Publishing, Paris(1991).
- W.H. Glaze, Environ. Sci. Technol., 21, 224-230 (1987).

